Funktionelle Bedeutung von VCAM-1 und $CD4^+$ T-Zellen für die Induktion einer protektiven Immunantwort bei der murinen Toxoplasmose

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sonja Lütjen
aus Bremen

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

am _____angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. K. Lingelbach

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. D. Schlüter

Tag der mündlichen Prüfung am

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

1.1 Der Vermehrungszyklus von *T.gondii* **1**
1.2 Humanmedizinische Bedeutung von *T.gondii*: Die Toxoplasmose **2**
1.3 Das Mausmodell der Toxoplasmose und das Modellantigen β-Galaktosidase **4**
1.4 Die Immunantwort gegen *T.gondii* **5**
1.4.1 Induktion, Funktion und Regulation der *T.gondii*-abhängigen Immunantwort 5
1.4.2 Die Rolle der $CD4^+$ T-Zellen bei der Vermittlung einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort 8
1.4.3 Immunpathogenese der zerebralen Toxoplasmose 10
1.4.4 Die Rekrutierung inflammatorischer Leukozytzen in das ZNS und die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 bei der zerebralen Toxoplasmose 12
1.5 Zielsetzung **15**

2. Material und Methoden **16**

2.1 Material

2.1.1 Geräte 16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 16
2.1.3 Kits 17
2.1.4 Antikörper 17
2.1.5 Antikörper aus Zellkulturüberständen 19
2.1.6 Chemikalien, immunologische und molekularbiologische Reagenzien 19
2.1.7 Zelllinien 20
2.1.8 *Toxoplasma*-Stämme 20
2.1.9 Maus-Stämme 20
2.1.10 Puffer, Lösungen und Medien 21

2.1.10.1 Puffer und Lösungen 21
2.1.10.2 Medien 23

2.2 Methoden 23

2.2.1 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von VCAM-1 23
2.2.1.1 Infektion der Versuchstiere 23
2.2.1.2 Herstellung von *Toxoplasma*-Antigen: Heat-Killed-*Toxoplasma* (HKT) 24
2.2.1.3 Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen 24
2.2.1.3.1 Leukozytenisolation aus dem Hirn 24
2.2.1.3.2 Leukozytenisolation aus der Milz 25
2.2.1.4 Serumgewinnung 25
2.2.1.5 Immunhistologie 25
2.2.1.6 Durchflusszytometrie 26
2.2.1.6.1 Rekrutierung und Aktivierung der Leukozyten in VCAM $^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen 27
2.2.1.7 Nachweis *T.gondii*-spezifischer Antikörper im Serum mittels ELISA 27
2.2.1.8 ELISPOT (Enzyme-linked immunospot assay) 28
2.2.1.9 Statistik 29
2.2.2 Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung $CD4^+$ T-Zellen 29
2.2.2.1 Infektion der Versuchstiere 29
2.2.2.2 Antikörpergewinnung 29
2.2.2.3 Depletion von $CD4^+$ T-Zellen 30
2.2.2.4 Serum- und Liquorgewinnung 30
2.2.2.5 Herstellung der MHC Kl. I-Tetramere 30
2.2.2.5.1 Herstellung rekombinanter Proteine 32
2.2.2.5.2 Die Faltung des MHC Kl. I/Peptid-Komplexes 32
2.2.2.5.3 Die Biotinylierung 33
2.2.2.5.4 Multimerisierung der MHC Kl. I/Peptid-Komplexe 34
2.2.2.6 Durchflusszytometrie 34
2.2.2.6.1 Phänotypische Charakterisierung der Milz-und Hirnleukozyten 34
2.2.2.6.2 Tetramer-Assay zur Detektion Antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen und Bestimmung des Aktivierungsstatus Tetramer-positiver Zellen 35

2.2.2.6.3 Nachweis der IFN-γ und TNF-α Produktion von Antigen-spezifischen $CD8^+$-Zellen 35
2.2.2.6.4 Nachweis der TNF-α Produktion und MHC Kl. II-Expression von Makrophagen und Mikroglia 36
2.2.2.7 Immunomagnetische Separation $CD4^+$ T-Zellen 36
2.2.2.8 Nachweis *T.gondii*-spezifischer Antikörper mittels ELISA 36
2.2.2.9 Nachweis der IFN-γ Produktion nicht-konventioneller $CD4^+$ T-Zellen in MHC Kl. II-defizienten Mäusen mittels ELISA 37
2.2.2.10 Zytotoxizitätstest (Chrom-release-assay) 37
2.2.2.11 Antikörpertransfer – Serotherapie 38
2.2.2.12 Immunhistologie 39

3. Ergebnisse 40

3.1 Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 bei der *Toxoplasma*-Enzephalitis 40
3.1.1 VCAM-1 Expression im Hirn von *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ und $VCAM^{flox/flox}$ (WT) Mäusen 40
3.1.2 Bestimmung des Gewichts, der Überlebensrate und der Anzahl intrazerebraler Toxoplasmen in $VCAM^{flox/floxMxCre}$ Mäusen 41
3.1.3 Einfluss der VCAM-1 Expression auf die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten nach einer *T. gondii*-Infektion 43
3.1.4 Bestimmung *T. gondii*-spezifischer Antikörper in infizierten und nicht-infizierten $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen 45
3.1.5 Frequenz *T.gondii*-spezifischer T-Zellen 46

3.2 Funktionelle Charakterisierung $CD4^+$ T-Zellen bei der Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort 47

3.2.1 Untersuchung *T.gondii*-infizierter CD4-depletierter CB6-Mäuse 47

3.2.1.1 Einfluss einer CD4-Depletion auf das Gewicht und Überleben von *T.gondii*-infizierten CB6-Mäusen 48

3.2.1.2 Histologischer Nachweis der Toxoplasmen im Gehirn 48

3.2.1.3 Phänotypische Charakterisierung der Milz- und Hirnleukozyten von infizierten, CD4-depletierten CB6-Mäusen und nicht-depletierten Kontrolltieren 49

3.2.1.4 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von $CD8^+$ T-Zellen in nicht-infizierten und *T.gondii*-infizierten, CD4-depletierten CB6-Mäusen und WT-Tieren 51

3.2.1.4.1 Frequenz und Aktivierungsstatus von β-$gal_{876-884}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen 51

3.2.1.4.2 β-$gal_{876-884}$–spezifische IFN-γ und TNF-α-Produktion von $CD8^+$ T-Zellen 54

3.2.1.4.3 Zytotoxische Aktivität von β-$gal_{876-884}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in *T.gondii*-infizierten, CD4-depletierten und nicht-depletierten CB6-Mäusen 56

3.2.1.5 Bestimmung *T.gondii*-spezifischer Antikörper im Serum und Liquor von infizierten CD4-depletierten und nicht-depletierten CB6-Mäusen 57

3.2.1.6 Bestimmung der Überlebensrate von CD4-depletierten CB6-Mäusen nach Behandlung mit *T.gondii*-spezifischem Immunserum 58

3.2.1.7 Bestimmung der TNF-α Produktion von zerebralen Makrophagen und Mikroglia 59

3.2.1.8 Untersuchung der MHC Kl. II-Expression zerebraler Makrophagen und Mikroglia 60

3.2.2 Untersuchung *T.gondii*-infizierter MHC Kl. II-defizienter Mäuse, CD4-depletierter MHC Kl. II-defizienter Mäuse und CD4-depletierter WT-Tiere 61

3.2.2.1 Bestimmung der Überlebensrate von *T.gondii*-infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen und CD4-depletierten, MHC Kl.II-defizienten Mäusen sowie CD4-depletierten WT-Mäusen und nicht-depletierten WT-Tieren 62

3.2.2.2 Histologischer Nachweis von intrazerebralen Toxoplasmen 63
3.2.2.3 IFN-γ Produktion von $CD8^+$ T-Zellen 64
3.2.2.4 Nachweis *T.gondii*-spezifischer Antikörper im Serum 65
3.2.2.5 Einfluss *T.gondii*-spezifischer Antikörper auf das Überleben *T.gondii*-infizierter MHC Kl. II-defizienter Mäuse 67
3.2.2.6 Funktionelle Charakterisierung von nicht-konventionellen, $CD4^+$ T-Zellen in MHC Kl. II- defizienten Mäusen 68
3.2.2.6.1 FN-γ Produktion nicht-konventioneller $CD4^+$ T-Zellen 68
3.2.2.6.2 CD1-Restriktion nicht-konventioneller $CD4^+$ T-Zellen 69

4. Diskussion 71

4.1 Die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 bei der *Toxoplasma*-Enzephalitis 71
4.2 Funktionelle Bedeutung von $CD4^+$ T-Zellen für die Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort 74

5. Zusammenfassung 81

6. Glossar 83

7. Abkürzungsverzeichnis 86

8. Literaturverzeichnis 88

9. Anhang 102
Publikationen 102
Lebenslauf 103
Danksagung 104
Selbständigkeitserklärung 105

1. Einleitung

Die Toxoplasmose ist eine Zoonose, die eine der häufigsten parasitären Infektionskrankheiten weltweit darstellt. *Toxoplasma gondii (T.gondii)*, der Erreger der Toxoplasmose, wurde erstmals 1908 von Nicolle und Manceaux aus einem nordafrikanischem Wüstennagetier (*Ctenodactylus gundi*) isoliert, dem der obligat intrazelluläre Parasit seinen Artennamen verdankt (Nicolle & Manceaux, 1908). Die Gattung *Toxoplasma* gehört zum Stamm der Apikomplexa, dem auch die Gattung *Plasmodium* (Malariaerreger) angehört.

1.1 Der Vermehrungszyklus von T.gondii

T. gondii kann aufgrund seiner geringen Zell- und Wirtsspezifität eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen und nahezu alle warmblütigen Vertebraten infizieren. Zwischenwirte können z.B. Schafe, Schweine, Vögel, Mäuse oder der Mensch sein. Endwirte sind nur Vertreter der Familie der Felidae, wie z.B. die Hauskatze (Abb. 1.1).

Die geschlechtliche Vermehrung (Gametogonie) des Einzellers vollzieht sieht sich ausschließlich im Endwirt. Der Erreger gelangt nach oraler Aufnahme von *Toxoplasma*-Zysten, z.B. über den Verzehr von *T.gondii*-infizierten Mäusen, in den Dünndarm der Katze, wo er sich in der ersten Phase zunächst im Dünndarmepithel ungeschlechtlich vermehrt. In der zweiten Phase setzt die geschlechtliche Vermehrung ein, die mit der Bildung geschlechtlich differenzierter Gamonten beginnt und mit der Entstehung von Oozysten (Zygote) endet. Mehrere Millionen Oozysten gelangen über den Kot in die Außenwelt und nach ca. 2-5 Tagen beginnt die Sporulation, bei der sich die hochinfektiösen Sporozoiten entwickeln.

Die ungeschlechtliche Vermehrung findet sowohl im Zwischenwirt als auch im Endwirt statt. Die Infektion erfolgt durch die orale Aufnahme von *Toxoplasma*-Zysten über den Verzehr von zystenhaltigem Fleisch. Eine weitere Infektionsquelle sind Sporozoiten, die über den Katzenkot in den Garten- und Ackerboden gelangen. Sie können über den Kontakt mit Sporozoiten-kontaminierten Böden (Finger-Mund-Übertragung) oder durch den Verzehr von Sporozoiten-kontaminiertem Gemüse aufgenommen werden.

Während der ungeschlechtlichen Vermehrung durchläuft *T. gondii* zwei unterschiedliche Differenzierungsformen, die als Tachyzoiten und Bradyzoiten bezeichnet werden. Für die

akute Phase der Infektion sind die schnell-proliferierenden, invasiven Tachyzoiten bezeichnend. Sie sind für das Krankheitsbild, die Toxoplasmose, verantwortlich.
Nachdem der Parasit *T.gondii* die Darmwand penetriert hat, erfolgt die Invasion über das Blut- und Lymphsystem in die kernhaltigen Zellen. Spezialisierte, apikal gelegene, Organellen charakteristisch für die Apikomplexa, ermöglichen den Parasiten in die Wirtszelle aktiv einzudringen und eine parasitäre Vakuole (PV) auszubilden. In der Vakuole vermehren sich die Parasiten durch Endodyogenie, einer asexuellen Form der Vermehrung, bei der sich zwei Tochterindividuen innerhalb der Mutterzelle ausbilden. Wenn die Parasiten schließlich die Zelle ausfüllen, platzt diese und setzt die Tachyzoiten frei, welche benachbarte Zellen befallen können.
Toxoplasma-Zysten stellen das Endstadium des Entwicklungszyklus bei der ungeschlechtlichen Vermehrung im Zwischenwirt dar und sind für die chronische Phase der Infektion bezeichnend. Innerhalb der Zysten befinden sich die langsam-vermehrenden, persistierenden Bradyzoiten. Obwohl *T. gondii* viele verschiedene kernhaltige Zellen infizieren kann, persistiert der Parasit bevorzugt in den Zellen des Muskelgewebes, des retikuloenendothelialen System sowie in den Neuronen des Zentralnervensystems (ZNS).

1.2 Humanmedizinische Bedeutung von T.gondii*: Die Toxoplasmose*

Bei der humanen Toxoplasmose werden zwei Formen unterschieden: Die postnatale und pränatale Toxoplasmose.
Die postnatale, nach der Geburt erworbene, Toxoplasmose verläuft im immunkompetenten Wirt meistens klinisch asymptomatisch oder subklinisch und geht mit Fieber und Lymphknotenschwellungen einher. *T. gondii* kann in Form von Gewebszysten, z.B. im ZNS, ein Leben lang im Wirt persistieren, ohne diesen dabei zu schädigen.
Immundefiziente Patienten können dagegen eine schwer verlaufende Toxoplasmose durch die Reaktivierung persistierender Parasiten oder durch eine primäre Infektion mit *T.gondii* entwickeln. Bei AIDS-(acquired immune deficiency syndrome) Patienten ist die zelluläre Immunantwort stark geschwächt. Die zerebrale Toxoplasmose (*Toxoplasma*-Enzephalitis) stellt die häufigste opportunistische Infektion des Gehirns bei HIV-(human immunodeficiency virus) Infizierten dar.
Immunsuppressiva, die bei Organ- und Knochenmarkstransplantationen oder in Folge einer Tumortherapie eingesetzt werden, können ebenfalls zu einer Erkrankung führen. Die

Toxoplasmose kann dabei durch die Reaktivierung persistierender Parasiten bedingt durch die immunsuppressive Behandlung ausgelöst werden. Die Transplantation von *T.gondii*-infizierten Organen kann aber auch eine Primärinfektion zur Folge haben. Unbehandelt führt die *Toxoplasma*-Enzephalitis (TE) nach wenigen Wochen zum Tod des Patienten. Eine prophylaktische Antibiotikatherapie schützt den Patienten und verhindert eine Infektion.

Die pränatale oder auch kongenitale (angeborene) Toxoplasmose wird vor der Geburt erworben. Infiziert sich eine schwangere Frau erstmalig mit *Toxoplasma*, wird in ca. 50% der Fälle auch der Fetus durch die transplazentale Übertragung der Tachyzoiten infiziert. Die möglichen Folgen einer *Toxoplasma*-Infektion sind im ersten Drittel einer Schwangerschaft besonders schwer. So kann es aufgrund einer massiven Schädigung des sich entwickelnden ZNS zum Abort des Fetus oder auch zur Ausbildung einer klassischen Trias (Hydrozephalus, intrazerebrale Verkalkung, Chorioretinitis) kommen. Findet die Übertragung zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft statt, sind die Folgen meist weniger dramatisch und die Toxoplasmose kann zunächst symptomlos verlaufen. Klinische Symptome treten dann erst nach Monaten oder Jahren auf, häufig in Form einer Retinochorioditis oder einer verschieden stark ausgeprägten geistigen Retardierung. Ist eine werdende Mutter dagegen bereits vor der Schwangerschaft infiziert, ist das Ungeborene durch die Immunität der Mutter geschützt.

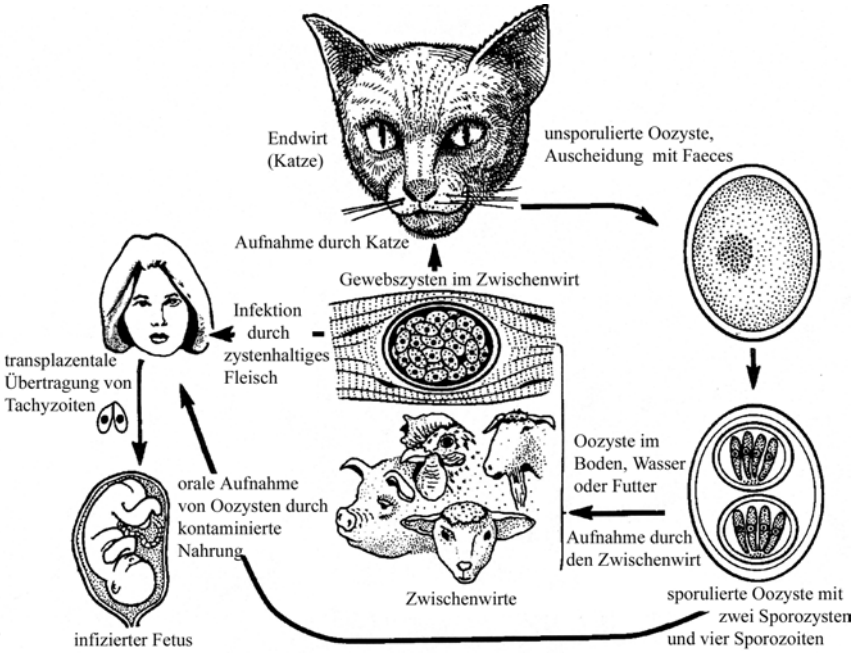


Abb. 1.1 Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii* (modifiziert nach Dubey *et al.*, 1998). Die Katze, der Endwirt, infiziert sich über die orale Aufnahme von Gewebszysten mit dem intrazellulären Parasiten *T.gondii*. Nur im Dünndarmepithel des Endwirten findet eine geschlechtliche Vermehrung statt. Die Entwicklung des Parasiten im Dünndarmepithel endet mit der Bildung unsporulierter Oozysten, die mit dem Kot in die Außenwelt ausgeschieden werden. Die Sporulation der Oozyste resultiert in der Ausbildung hochinfektiöser Sporozoiten. Die Infektion der Zwischenwirte, einschließlich des Menschen, erfolgt durch die orale Aufnahme von Sporozoiten oder durch zystenhaltiges Fleisch. Im Zwischenwirt vermehrt sich *T.gondii* ungeschlechtlich durch Endodyogenie. Eine werdende Mutter kann das Ungeborene durch die transplazentale Übertragung von Tachyzoiten infizieren.

1.3 Das Mausmodell der Toxoplasmose und das Modellantigen β-Galaktosidase

Der heutige Wissensstand der *Toxoplasma*-Immunologie basiert im Wesentlichen auf experimentellen Studien mit Mäusen. Nach Infektion mit *T.gondii*-Zysten entwickeln Mäuse eine generalisierte Toxoplasmose, die viele Organe betrifft.

Bei der experimentellen Untersuchung der Toxoplasmose werden unterschiedliche murine Modelle verwendet. So gibt es *T.gondii*-resistente Maus-Stämme wie z.B. Sv129, BALB/c (H-2^{d}) oder CB6 (H-$2^{b/d}$), die nach oraler Infektion eine chronisch latente, klinisch asymptomatische, zerebrale Toxoplasmose entwickeln. Der Infektionsverlauf *T.gondii*-resistenter Mäuse ähnelt der humanen Toxoplasmose (Schlüter *et al*, 1991). Andere Maus-Stämme sind dagegen *T.gondii*-suszeptibel (z.B. C57BL/6 (H-2^{b})) und entwickeln aufgrund einer unzureichenden zerebralen Immunantwort eine progressive, letale TE. Die Suszeptibilität ist genetisch bedingt. Viele immungenetische Studien belegen, dass insbesondere das MHC Klasse I L^{d}-Molekül einen Schutz gegen eine Toxoplasmose vermittelt (Brown *et al*., 1995, Suzuki *et al*., 1994, McLeod *et al*., 1989).

Obwohl das MHC Klasse I-Molekül entscheidend für die Antigen-Erkennung durch $CD8^{+}$ T-Zellen ist, sind bisher keine MHC Kl. I-abhängigen, immundominanten Epitope von *T.gondii* bekannt. β-Galaktosidase aus *Escherichia coli* enthält definierte CD8 T-Zellepitope. Daher wurde β-Galaktosidase in verschiedenen immunologischen Studien als Modellantigen verwendet (Medina *et al*., 2000, Buckner *et al*., 1997, Darji *et al*., 1997, Overwijk *et al*., 1997, Rammensee *et al*., 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde β-Galaktosidase als Modellantigen in transfizierten Toxoplasmen exprimiert (Kwok *et al*., 2003), um so die $CD8^{+}$ T-Zellantwort in *T. gondii*-infizierten CB6-Mäusen (H-2^{bxd}) Peptid-spezifisch zu untersuchen.

1.4 Die Immunantwort gegen T.gondii

Für die Kontrolle des obligat intrazellulären Parasiten *T. gondii* spielt die zelluläre Immunantwort eine tragende Rolle. Die zelluläre Immunantwort erfolgt durch T-Zellen, die für die Kontrolle des Erregers essentiell sind. Sowohl $CD8^+$ als auch $CD4^+$ T-Zellen produzieren das Zytokin Interferon (IFN)-γ, das eine protektive Immunantwort gegen *T. gondii* während der akuten und chronischen Phase der Infektion vermittelt. Natürliche Killerzellen (NK)-Zellen sind dagegen für die initiale, T-Zell-unabhängige IFN-γ Produktion während der akuten Phase der Infektion verantwortlich.
Eine zentrale Funktion von IFN-γ ist die Aktivierung anti-parasitärer Effektormechanismen in *T.gondii*-infizierten Makrophagen. Neben der zellulären Immunantwort induziert *T. gondii* eine starke humorale Immunantwort. So tragen B-Zellen über die Bildung *T. gondii*-spezifischer Antikörper zur Immunantwort gegen *T.gondii* bei.

1.4.1 Induktion, Funktion und Regulation der T.gondii-*abhängigen Immunantwort*

Für die Wachstumskontrolle von *T.gondii* ist die Interaktion und Koordination einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen und Zytokine nötig.
Eine wichtige Komponente in der akuten Phase der murinen Toxoplasmose ist die Produktion von Interleukin (IL)-12, das von *T. gondii*-stimulierten, dendritischen Zellen (DC`s) und neutrophilen Granulozyten gebildet wird. IL-12 initiiert eine starke T-Zellantwort, wie sie für die Kontrolle intrazellulärer Pathogene typisch ist. So bewirken IL-12 und IFN-γ die Proliferation und Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in TH-1 Effektorzellen und naiver $CD8^+$ T-Zellen in $CD8^+$ Effektorzellen (Gazinelli *et al*., 1994, Gajewski *et al*., 1988, Suzuki & Remington, 1988). IL-12 löst außerdem T-Zell-unabhängig die IFN-γ Produktion durch NK-Zellen aus (Gazzinelli *et al*., 1993, Gazzinelli *et al*., 1994b) und wird dabei durch die kostimulierende Wirkung von Tumornekrosisfaktor (TNF)-α, IL (Interleukin)-1 und IL-15 unterstützt (Hunter *et al*., 1997, Carson *et al*., 1995, Hunter *et al*., 1995, Gazzinelli *et al*., 1993, Hunter *et al*., 1993). Die T-Zell-unabhängige IFN-γ Produktion durch NK-Zellen ist für die Aktivierung von Makrophagen in der akuten Phase der Infektion entscheidend. Durch NK-Zellen aktivierte Makrophagen können die Tachyzoitenproliferation limitieren, bevor eine T-Zell-abhängige Immunantwort einsetzt. Hat sich eine *T.gondii*-spezifische T-Zellantwort etabliert, wirkt deren IFN-γ stimulatorisch auf die IL-12 Produktion von

Makrophagen (Ma *et al*., 1996, Gazzinelli *et al*., 1994a, Gazzinelli *et al*.,1993). Makrophagen produzieren zudem Chemokine, wie z.B. Monokine induced by IFN-γ (MIG) und Interferon-induced Protein of 10kDA (IP-10), die für die Rekrutierung der T-Zellen verantwortlich sind.
Neben ihrer phagozytierenden Eigenschaft haben aktivierte Makrophagen unterschiedliche antiparasitäre Mechanismen entwickelt, um den intrazelluären Parasiten zu eliminieren. Ein wichtiger Mechanismus ist die Bildung von reaktiven Stickstoffoxiden (NO), die in murinen Makrophagen durch IFN-γ und TNF-α sowie IL-1 induziert werden kann (James, 1995, Chao *et al*., 1993). Neben dem anti-parasitären Effekt hat NO auch eine immunregulatorische Wirkung und kann die Zytokinproduktion und T-Zell-Proliferation supprimieren und somit den Wirt vor *T.gondii*-induzierten, immunpathologischen Schäden schützen (Hayashi *et al*., 1996, Candolfi *et al*., 1994). Der Abbau der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) stellt einen weiteren antiparasitären Mechanismus dar (Silva *et al*., 2002). Insbesondere für humane Makrophagen, die nur begrenzt NO synthetisieren können, ist dieser Schutzmechanismus von Bedeutung. Die Bildung von Sauerstoffradikalen durch aktivierte Makrophagen spielt für die Hemmung der Parasitenreplikation eher eine untergeordnete Rolle (Wilson & Remington,1980, Murray *et al*., 1979), zumal *T.gondii* mittels Katalase und Superoxid-Dismutase die toxischen Sauerstoffradikale neutralisieren kann (Sibley *et al*., 1986). TNF-α wirkt mit IFN-γ bei der Makrophagenaktivierung synergistisch (Langermans *et al*., 1992, Adams *et al*., 1990). Es wird sowohl von aktivierten Makrophagen selbst gebildet, als auch von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Effektorzellen produziert (Gazzinelli *et al*., 1996a).
$CD4^+$ und $CD8^+$ T-Effektorzellen sind für die Erregerkontrolle von grundlegender Bedeutung. Damit naive T-Zellen zu T-Effektorzellen differenzieren können, müssen diese aber zunächst über ihren T-Zellrezeptor und dem Korezeptor, CD4 oder CD8, mit dem Peptid-MHC-Komplex einer antigenpräsentierenden Zelle interagieren. Während $CD4^+$ T-Zellen MHC Kl. II-Peptid-Komplexe erkennen, binden $CD8^+$ T-Zellen an den MHC Kl. I-Peptid-Komplex. Antigenpräsentierende Zellen (APZ), wie Dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen, wirken zudem über verschiedene Oberflächenmoleküle wie z.B. B7 kostimulierend auf naive T-Zellen. Die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen ist außerdem von IL-2-abhängig, das von stimulierten T-Zellen selbst gebildet wird.
Eine wichtige Effektorfunktion von $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen ist die Produktion von IFN-γ $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen sind neben NK-Zellen wesentlich an der Produktion dieses protektiven Zytokins beteiligt (Gazzinelli *et al*., 1992, Gazzinelli *et al*., 1991, Suzuki & Remington, 1988). $CD4^+$ T-Zellen wirken außerdem aktivierend auf B-Zellen.

Untersuchungen B-Zell-defizienter Mäuse belegen, dass B-Zellen durch die Bildung spezifischer Antikörper in *T.gondii*-infizierten Mäusen zum Schutz gegen *T.gondii* beitragen (Sayles *et al*., 1999). Möglicherweise blockieren *T.gondii*-spezifische Antikörper eine Infektion der Wirtszelle durch Tachyzoiten (Sayles *et al*., 1999). IgG2a ist bei einer *Toxoplasma*-Infektion der predominante Antikörper. Der Isotypenwechsel wird u.a. durch IFN-γ induziert (Finkelman *et al*., 1990, Huskinson *et al*., 1989, Handman *et al*., 1980).
$CD8^+$ Effektorzellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Erregerkontrolle während der akuten und chronischen Phase der Infektion, wie *in vivo* Depletionsstudien und adoptive Transferexperimente zeigen (Khan *et al*., 1994, Gazzinelli *et al*., 1991, Suzuki & Remington, 1988). Eine der Schlüsselfunktionen $CD8^+$ Effektorzellen ist die Produktion von IFN-γ. Aber auch ihre MHC Kl. I-abhängige zytotoxische Aktivität trägt zur Erregerkontrolle, insbesondere während der chronischen Phase der Infektion, bei (Nakano *et al*., 2001, Denkers *et al*., 1998). Perforine, die an der Zielmembran infizierter Zellen Poren ausbilden, und Granenzyme (Proteasen) werden von aktivierten, zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen freigesetzt und vermitteln die Induktion der Apoptose und damit den Zelltod der infizierten Zielzelle. Auch Untersuchungen an Perforin-defizienten, *T.gondii*-infizierten Mäusen bestätigen, dass Perforine für die zytotoxische Aktivität $CD8^+$ T-Zellen notwendig sind (Denkers *et al*., 1997).
Die durch *T.gondii* induzierte, zellvermittelte Immunantwort erfordert eine strikte Regulation, um die Infektion zu kontrollieren und die Parasitenproliferation zu inhibieren, aber auch um eine überschießende Immunantwort und daraus mögliche resultierende, immunpathologische Schäden zu verhindern. IL-10 ist ein wichtiges immunsuppressives, regulatorisches Zytokin und wird neben Makrophagen von einer Vielzahl anderer Zellen, wie TH2-Lymphozyten, B-Zellen und Mastzellen, produziert. Es wirkt antagonistisch zu IFN-γ. Eine der Hauptfunktionen ist die Inhibition der Zytokin-Synthese (IL-1, TNF-α, IL-12) durch Makrophagen (Trinchieri *et al*., 1993, D`Andrea *et al*., 1993, Gazzinelli *et al*., 1992, Fiorentino *et al*., 1991). Da IL-12 auf NK-Zellen und TH1-Lmphozyten aktivierend wirkt, wird über die Inhibition der IL-12 Synthese durch IL-10 die IFN-γ Produktion von NK-Zellen und TH1-Lmphozyten unterbunden (Gazzinelli *et al*., 1996b, Tripp *et al*., 1993, Bogdan *et al*., 1991). IL-4 sowie TGF-β wirken ebenfalls immunregulatorisch und können die durch IL-10 hervorgerufenen Effekte noch verstärken (Roberts *et al*., 1996, Sher *et al*., 1992, Tsunawaki *et al*., 1988).

1.4.2 Die Rolle der CD4$^+$ T-Zellen bei der Vermittlung einer **T.gondii-***spezifischen Immunantwort*

$CD4^+$ T-Zellen tragen als Effektoren und Regulatoren zu einer Immunantwort bei. $CD4^+$ T-Zellen werden dabei funktionell in TH-1 und TH-2 $CD4^+$ T-Zellen unterteilt und unterscheiden sich in ihrem Zytokinprofil. Während die Produktion von IL-2, IFN-γ, TNF-α und TNF-β für inflammatorische (TH-1) $CD4^+$ T-Zellen bezeichnend ist und auch bei der Toxoplasmose dominiert, produzieren $CD4^+$ Helferzellen (TH2) vorwiegend IL-4, IL-10, IL-5, IL-6 und IL-13. Häufig besteht aber keine strikte Trennung dieser zwei Subpopulationen, sondern es sind vielmehr fließende Übergänge möglich.

Zu den Effektormechanismen der $CD4^+$ T-Zellen gehört die Produktion von IFN-γ, das für die zellvermittelte Immunität gegen *T.gondii* und anderer intrazellulärer Parasiten charakteristisch ist (Gazzinelli *et al*., 1992, Gazzinelli *et al*., 1991, Suzuki & Remington 1988). Im Gegensatz zu der Maus üben $CD4^+$ T-Zellen im *T.gondii*-infizierten Menschen außerdem zytotoxische Effektorfunktionen aus (Montoya *et al*., 1996, Purner *et al*., 1996, Curiel *et al*., 1993, Canessa *et al*., 1988).

Als Regulatoren sind $CD4^+$ T-Zellen in der Lage mittels IFN-γ Makrophagen zu aktivieren, die für die Abtötung insbesondere intrazellulärer Pathogene, einschließlich *T.gondii*, essentiell sind (Bogdan *et al*., 2000, Hayashi *et al*., 1996, James, 1995).

Außerdem tragen $CD4^+$ T-Zellen möglicherweise zur Generierung von $CD8^+$ Effektorzellen bei. So benötigen bei verschiedenen Virusinfektionen $CD8^+$ T-Zellen für ihre Differenzierung die Hilfe von $CD4^+$ T-Zellen, während andere $CD8^+$ T-Zellen auch in Abwesenheit von $CD4^+$ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren (Schönberger *et al*., 1998, Bennett *et al*., 1997, Cardin *et al*., 1996, von Herrath *et al*., 1996, Rahemtulla *et al*., 1991, Buller *et al*., 1987, Keene *et al*., 1982). Es wird angenommen, dass $CD4^+$ T-Zellen durch die Produktion von IL-2 aktivierend auf $CD8^+$ T-Zellen wirken, wenn diese nur unzureichend von einer APZ stimuliert werden. Es ist aber auch denkbar, dass aktivierte $CD4^+$ T-Zellen, die CD40 exprimieren, via einer CD40L/CD40-Interaktion mit dendritischen Zellen (APZ) interagieren, und so deren kostimulierende Kapazität verstärken. Eine solche konditionierte dendritische Zelle kann möglicherweise die Differenzierung von $CD8^+$ T-Zellen in zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen vermitteln (Bennett *et al*., 1998, Denkers *et al*., 1998, Ridge *et al*., 1998, Keene *et al*., 1992).

Bei der Toxoplasmose ist die Rolle der $CD4^+$ T-Zellen bei der Generierung zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen nur unzureichend geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass die IL-2 Synthese

durch $CD4^+$ T-Zellen für eine optimale Induktion der IFN-γ Produktion bei einer Infektion mit *T.gondii* notwendig ist (Villegas *et al*., 1999, Gazzinelli *et al*., 1991). In IL-2-defizienten Mäusen ist zudem die IFN-γ Bildung der Milzleukozyten beeinträchtigt (Villegas *et al*., 2002). Untersuchungen zur IFN-γ Produktion und Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen in *T.gondii*-suzeptiblen, CD4-defizienten Mäusen (CD4-Knock-out Maus) haben dagegen ergeben, dass $CD4^+$ T-Zellen nicht für die Induktion sondern für die Aufrechterhaltung einer CD8-vermittelten *T.gondii*-spezifischen Immunantwort benötigt werden (Casciotti *et al*., 2002).

Zusammenfassend ergeben die bisherigen Untersuchungen sowohl Hinweise darauf, dass $CD4^+$ T-Zellen für die Induktion und Aufrechterhaltung einer *T.gondii*-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort notwendig als auch entbehrlich sein können.

Die Rolle der $CD4^+$ T-Zellen bei der Generierung einer Immunantwort gegen *T.gondii* wurde außerdem in verschiedenen Depletionsstudien untersucht. Durch die Behandlung der Mäuse mit anti-CD4-Antikörpern werden $CD4^+$ T-Zellen über den klassischen Weg der Komplementkaskade Antikörper-abhängige lysiert. Solche Mäuse besitzen damit keine $CD4^+$ T-Zellen mehr. Die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen vor und nach einer *T.gondii*-Infektion führt zu einer erhöhten Mortalitätsrate im Vergleich zu nicht-depletierten Kontrolltieren (Nagasawa *et al*., 1991, Vollmer *et al*., 1987).

T.gondii induziert neben der zellulären eine starke humorale Immunantwort. Die Aktivierung von B-Zellen und ihre Differenzierung zu antikörpersezernierenden Zellen erfordert gewöhnlich die Hilfe von $CD4^+$ T-Zellen. Vollmer *et. al.* 1987 haben nachgewiesen, dass das Fehlen *T.gondii*-spezifischer Antikörper während der akuten Phase der Infektion zum letalen Verlauf beiträgt. Auch Untersuchungen *T.gondii*-suszeptibler, CD4-defizienter Mäuse machen deutlich, dass $CD4^+$ T-Zellen für die Bildung *T.gondii*-spezifischer Antikörper notwendig sind (Johnson & Sayles, 2002, Sayles *et al*., 1999). So sind *T.gondii*-infizierte, CD4-defiziente Mäuse in ihre Antikörperproduktion stark beeinträchtigt und zeigen eine verringerte Überlebensrate, während *T.gondii*-spezifische Antikörper die Resistenz gegenüber einer *T.gondii*-Infektion erhöhen (Johnson & Sayles, 2002). Ob *T.gondii*-spezifische Antikörper auch in CD4-defizienten, *T.gondii*-resistenten Mäusen protektiv wirken, wurde bisher nicht analysiert.

Neben der Untersuchung CD4-defizienter und CD4-depletierter Mäuse geben auch Studien MHC Kl. II-defizienter Mäuse Aufschluss über die funktionelle Rolle von $CD4^+$ T-Zellen. Obwohl MHC Kl. II-defiziente Mäuse keine MHC Kl. II-Moleküle exprimieren, verfügen sie doch über eine kleine Population MHC Kl. II-unabhängiger $CD4^+$ T-Zellen.

$CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen reifen im Thymus. Der Reifungsprozess wird in zwei Schritte unterteilt: die positive Selektion (Selbst-MHC-Restriktion) und negative Selektion (Eliminierung autoreaktiver T-Zellen). Bei beiden Prozessen spielen gewöhnlich MHC-Moleküle eine wichtige Rolle. Während für die Selektion von $CD8^+$ T-Zellen MHC Kl. I notwendig ist, wird die Selektion von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen durch MHC Kl. II vermittelt. MHC Kl. II-unabhängige, nicht-konventionelle $CD4^+$T-Zellen werden dagegen durch das MHC Kl. I-ähnliche Molekül CD1 im Thymus MHC Kl. II-defizienter Mäuse selektioniert und können auch NK1.1 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Bendelac *et al*., 1997, Cardell *et al*., 1995). Im Gegensatz zu konventionellen $CD4^+$ T-Zellen sind $CD4^+NK1.1^+$ T-Zellen auch in Abwesenheit von IL-4 nach CD1-Stimulation in der Lage IL-4 zu produzieren. Da für die Differenzierung $CD4^+$ TH2 T-Zellen IL-4 benötigt wird, tragen $CD4^+NK1.1^+$ T-Zellen möglicherweise auch zur Initiierung einer TH2-Antwort bei (Chen & Paul, 1997 Denkers *et al*., 1996). Aktivierte $CD4^+NK1.1^+$ T-Zellen bilden neben IL-4 und IFN-γ auch IL-2 (Denkers *et al*., 1996, Yoshimoto & Paul, 1994). Es wird angenommen, dass insbesondere in der frühen Phase einer *T.gondii*-Infektion IL-2 produzierende $CD4^+NK1.1^+$ T-Zellen in MHC Kl. II-defizienten Mäusen für die Generierung von $CD8^+$ Effektorzellen verantwortlich sind (Denkers *et al*., 1997, Denkers *et al*., 1996). Ob nicht-konventionelle $CD4^+$ T-Zellen *T.gondii*-infizierter Mäuse CD1-abhängig IFN-γ produzieren und über die IFN-γ Produktion zum Schutz gegen *T.gondii* beitragen, ist nicht bekannt.

1.4.3 Immunpathogenese der zerebralen Toxoplasmose

Obwohl *T.gondii* nahezu alle Organe befallen kann, wird der Erreger durch das Immunsystem in den meisten Organen erfolgreich eliminiert. Eine Ausnahme stellt das Gehirn dar, wo *T.gondii* in Form von Zysten ein Leben lang persistiert (Schlüter *et al*., 1991).

Das ZNS wird traditionell als immunologisch privilegiertes Organ beschrieben, da die zelluläre Immunantwort aufgrund der Blut-Hirn-Schranke eingeschränkt ist, sich das ZNS durch eine geringe MHC-Expression sowie eine immunsuppressive Umgebung auszeichnet und ein konventionelles, lymphatisches System fehlt (Luft *et al*., 1993, Wekerle *et al*., 1993, Fontana *et al*., 1987, Cserr *et al*., 1992). Im ZNS persistiert *T. gondii* bevorzugt in Neuronen, deren fehlende Expression von MHC-Antigenen eine MHC-abhängige Erkennung durch T-Zellen verhindert (Schlüter *et al*., 1991). Neben Neuronen werden auch Mikroglia und

Astrozyten insbesondere in der frühen Phase der TE durch *T.gondii* infiziert (Halonen *et al*., 1998a b, Chao *et al*., 1993, Ferguson & Hutchison, 1987, Jones *et al*., 1986).

Wie *T.gondii* die Invasion in das Gehirn gelingt, ist noch unklar. Möglicherweise dienen infizierte Zellen, wie z.B. Makrophagen, die in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, *T.gondii* als Vehikel und transportieren den Parasiten in das Gehirn. Es ist aber auch denkbar, dass die Infektion und Destruktion der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke ein nachfolgendes Eindringen von *T.gondii* in das Gehirn ermöglicht.

Die immunologische Kontrolle intrazerebraler Parasiten wird durch die Infiltration peripherer, aktivierter Lymphozyten sowie hirneigener Zellen, wie etwa die residente Mikroglia, vermittelt.

So werden in der akuten Phase der TE aktivierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und B-Zellen in das Gehirn rekrutiert (Bliss *et al*., 2000, Schlüter *et al*., 1997, Schlüter *et al*., 1995, Hunter *et al*., 1994, Schlüter *et al*., 1991). Während der chronischen Phase der Infektion findet keine weitere Rekrutierung statt. Die Anzahl intrazerebraler T-Zellen sinkt bis ein Pool an T-Zellen übrig bleibt, der die Kontrolle des persistierenden Parasiten sichert. Bei der Abnahme intrazerebraler T-Zellen scheinen u.a. apoptotische Vorgänge mitzuwirken (Schlüter *et al*., 2002). Rekrutierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen tragen über die Produktion von IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α und IFN-γ entscheidend zur Erregerkontrolle und Regulation der Immunantwort im Gehirn bei (Schlüter *et al*., 1997). Während IL-2 und IL-4 auch neuroprotektive Funktionen ausüben können (Suzuki *et al*., 1996, Awatsuji *et al*., 1993, Hayashi *et al*., 1993,), regulieren insbesondere IFN-γ produzierende $CD8^+$ T-Zellen die Zytokinsynthese der Mikroglia (Schlüter *et al*.,2001).

Die Mikroglia, die residente Makrophagenpopulation des Gehirns, wandert während der frühen Embryonalentwicklung in das Gehirn (Hickey *et al*., 1988). Die prominente Aktivierung der Mikroglia ist ein Charakteristikum der TE. Sie geht mit einer erhöhten Synthese von IL-1, TNF-α, IL-15 und einer Induktion von IL-12 und iNOS (induzierbare NO-Synthase) einher. Die Mikroglia zeigt damit eine, wie auch für andere Makrophagenpopulationen, typische Zytokinexpression (Doherty *et al*., 1996, Gazzinelli *et al*., 1994a, Langermans *et al*., 1992).

Murine Mikroglia trägt im Wesentlichen durch die Bildung von NO zur Abtötung intrazellulärer Toxoplasmen bei (Scharton-Kersten *et al*., 1997, Chao *et al*., 1993). Für die Aktivierung der Mikroglia ist IFN-γ unerlässlich (Schlüter *et al*., 1999, Deckert-Schlüter *et al*., 1996, Scharton-Kersten *et al*., 1996). TNF-α scheint dagegen eine synergistische Funktion auszuüben und die IFN-γ-abhängige NO-Produktion zu unterstützen (Schlüter *et al*.,

1999, Schlüter *et al*., 1998). Aktivierte Mikroglia kann im Gegensatz zu vielen anderen residenten Zellpopulationen *de novo* MHC Kl. I und II-Molekülen exprimieren und damit, neben infiltrierten B-Zellen und Makrophagen, restimulierend und regulierend auf infiltrierte T-Zellen einwirken. Andere Oberflächenmoleküle, wie Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1, Leukocyte Function-Associated molecule (LFA)-1 und Mac-1 (CD11b) werden ebenfalls von aktivierter Mikroglia während der murinen TE induziert oder verstärkt gebildet (Schlüter *et al*., 2001, Deckert-Schlüter *et al*., 1994).

Neben der Mikroglia können auch murine Astrozyten, die ebenfalls wie die Mikroglia den Gliazellen angehören, IFN-γ-abhängig die Tachyzoitenproliferation inhibieren. Anders als bei humanen Astrozyten wird dieser Schutz aber weder durch NO noch durch IDO vermittelt. IFN-γ kann dabei in seiner Funktion durch TNF-α, IL-1 oder IL-6 unterstützt werden (Halonen *et al*., 1998a). Wie auch aktivierte Mikroglia sind aktivierte Astrozyten neben der Produktion von TNF-α in der Lage, die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 zu bilden und dadurch zur Infiltration der Leukozyten in das Gehirn beizutragen (Fischer *et al*., 1997).

1.4.4 Die Rekrutierung inflammatorischer Leukozytzen in das ZNS und die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 bei der zerebralen Toxoplasmose

Für die regulierte Rekrutierung aktivierter Leukozyten in das Zielorgan, einschließlich des Gehirns, sind neben Zytokinen sowohl Chemokine als auch Zelladhäsionsmoleküle verantwortlich. Chemokine sind chemotaktische Polypeptide, die die Leukozytenaktivierung und Chemotaxis vermitteln und somit zur Migration der Lymphozyten beitragen (Cyster *et al*.,1999).

Die Produktion von Chemokinen im ZNS ist besonders gut dokumentiert. Zelluläre Quellen können Gliazellen als auch Endothelzellen selbst sein (McManus *et al*., 1998, Weiss *et al*., 1998, Zach *et al*., 1997). Mikroglia und Astrozyten, die neben den Endothelzellen einen wesentlichen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke ausmachen (Lassmann.,1991), können beispielsweise Chemokine, wie Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1α und Macrophage Chemoattractant and activation factor (MCP)-1, produzieren (Karpus & Kennedy,1997, Ransohoff *et al*., 1997). Bei der TE können *T.gondii*-infizierte Neuronen durch die Produktion von MIP-1α und -1β die Infiltration inflammatorischer Leukozyten in das Gehirn unterstützen (Schlüter *et al*., 2001). Auch Interferon-induced Protein of 10kDA

(IP-10) ist für die Rekrutierung von T-Effektorzellen in *T.gondii*-infizierte-Organe verantwortlich (Khan *et al*., 2000).

Zelladhäsionsmoleküle tragen neben Chemokinen entscheidend zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen in das ZNS sowie anderer Zielorgane bei.

Bei der Rekrutierung der Leukozyten wird die Interaktion zwischen Leukozyt und Endothelzellen in verschiedene Schritte unterteilt (Multi-Step-Modell). Zunächst rollt die Zelle auf dem vaskulärem Endothel entlang (roling). Sie wird dann aktiviert und adhäriert auf dem Endothel bis sie schließlich durch das Endothel transmigriert und so den Blukreislauf verlässt, um im Gewebe zum Ort der Inflammation vorzudringen.

Das Zelladhäsionsmolekül Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1 (CD106) gehört der Immunglobulinsupergen-Familie an. Es dirigiert die Rekrutierung der Leukozyten im Wesentlichen durch die Bindung von $\alpha 4\beta 1$ Integrin (Very Late Antigen (VLA)-4; CD49d/CD29) sowie mit geringer Affinität von $\alpha 4\beta 7$ Integrin (CD49d/Integrin $\beta 7$; lymphocyte Peyer`s patch adhesion molecule (LPAM)-1) (Laschinger & Engelhardt, 2000, Wong *et al*., 1999, Dopp *et al*., 1994). Über die Rolle von VCAM-1 als auch anderer Zelladhäsionsmoleküle ist bei der TE nur wenig bekannt. Im nicht-infizierten murinen Gehirn wird VCAM-1 konstitutiv von den Epithelzellen des Plexus choroideus, dem liquorbildenden Adergeflecht der Hirnkammern, exprimiert. Dagegen bilden Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße kein VCAM-1 (Steffen *et al*., 1996, Deckert-Schlüter *et al*., 1994). Bei der murinen TE induziert der Parasit *T.gondii* eine verstärkte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 sowie MHC KL. I und II auf den Endothelzellen des Gehirns (Deckert-Schlüter *et al*., 1994, Schlüter *et al*., 1991). Neben VCAM-1 vermittelt auch das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 über die Interaktion mit VLA-4 und LFA-1, das von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, die Adhäsion der T-Zellen an das Endothel (Wong *et al*., 1999, Dopp *et al*., 1994). Die maximale Induktion der Oberflächenmoleküle VCAM-1, ICAM-1, MHC KL. I und MHC KL. II ist wesentlich von IFN-γ, nicht aber von TNF-α abhängig (Deckert-Schlüter *et al*., 1999). Neben der Toxoplasmose induzieren auch andere Infektions- sowie Autoimmunerkrankungen des ZNS die Expression von VCAM-1 auf den zerebralen Endothelzellen. Verschiedene virale Infektionskrankheiten induzieren eine endotheliale VCAM-1-Expression (Burns *et al*., 1999, Shahgasempour *et al*., 1997). Beispielsweise führt die HIV-Infektion zu einer erhöhten Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin und zu einer verstärkten Adhärenz der Leukozyten an das Endothel (Zietz *et al*., 1996). Die Einwanderung autoreaktiver T-Zellen in das ZNS ist einer der ersten Schritte während der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) und der Experimentellen

Autoimmunenzaphalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der menschlichen MS. Studien belegen, dass VCAM-1 und VLA-4 für die Interaktion von T-Zellen und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke während der EAE verantwortlich sind und insbesondere die Adhäsion der T-Zelle an das Endothel vermitteln (Laschinger & Engelhartd, 2000, Engelhardt *et al*., 1998, Barten *et al*., 1994, Dopp *et al*., 1994, Yednock *et al*., 1992).

Zelladhäsionsmoleküle regulieren aber nicht nur die Rekrutierung von Leukozyten, sondern sind auch an einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Immunreaktionen, wie die Reifung von Lymphozyten und die Aktivierung, Kostimulierung sowie Generierung spezifischer Immunantworten beteiligt. So wird neben der induzierbaren Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen, VCAM-1 auch auf den Stromazellen des Knochenmarks konstitutiv exprimiert (Miyake *et al*., 1991). Es ist daher naheliegend, dass VCAM-1 bei der Reifung von B-Zellen im Knochenmark mitwirkt (Arroyo *et al*., 1999, Papayannopoulou *et al*., 1995, Papayannopoulou & Nakamoto, 1993, Miyake *et al*., 1991). VCAM-1 wird außerdem konstitutiv auf follikulären dendritischen Zellen exprimiert (Koopman *et al*., 1991, Freedman *et al*., 1990), die entscheidend zur Antigenpräsentation beitragen und die sequentielle Proliferation und Selektion von B-Zellen lenken. So ist die Interaktion von VLA-4 und VCAM-1 auch an der Adhäsion humaner B-Zellen an follikuläre dendritische Zellen beteiligt. Es ist daher anzunehmen, dass diese Zelladhäsionsmoleküle bei der Reifung von B-Zellen im Keimzentrum mitwirken (Koopman *et al*., 1997, Koopman *et al*., 1994, Koopman *et al*., 1991, Freedman *et al*., 1990). Für die optimale Antigen-abhängige Proliferation von T-Zellen werden kostimulierende Moleküle benötigt. Studien belegen, dass VCAM-1 sowohl zur Reifung als auch zur Kostimulierung von T-Zellen beiträgt (Schlegel *et al*., 1995, Damle *et al*., 1992, Burkly *et al*., 1991). Außerdem ist VCAM-1 für die Vermittlung einer optimalen T-Zell-abhängigen, humoralen Immunantwort von Bedeutung (Leuker *et al*., 2001).

Bisher waren umfassende Untersuchung zur *in vivo* Funktion des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 meist nicht möglich, da Mäuse mit einer VCAM-1-Deletion schon früh während der Embryogenese versterben (Kwee *et al*., 1995, Gurtner *et al*., 1995, Terry *et al*., 1997). Erst kürzlich wurden konditionale VCAM-1-defiziente Mäuse mit Hilfe des Cre/loxP Rekombinationssystems entwickelt (Leuker *et al*., 2001). Durch die IFN-α-induzierbare Rekombinase Cre werden die loxP-flankierten VCAM-1 Allele der Maus durch einen Rekombinationsvorgang neonatal deletiert, so dass eine funktionelle Analyse des Zelladhäsionsmoleküls *in vivo* möglich ist. In dieser Arbeit wurden diese konditionalen VCAM-1 mutanten Mäuse verwendet, um erstmals die Funktion dieses Zelladhäsionsmoleküls bei einer murinen Infektionserkrankung *in vivo* zu untersuchen.

1.5 Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 erstmals bei einer murinen Infektionserkrankung, der Toxoplasmose, zu ermitteln. Dazu wurden konditionale, VCAM-1-defiziente Mäuse verwendet. Es wurde untersucht, ob die

1. Rekrutierung der Leukozyten in das Gehirn
2. Generierung einer *T.gondii*-spezifischen B-Zellantwort
3. und Frequenz sowie Aktivierung intrazerebraler *T.gondii*-spezifischer T-Zellen

verringert ist. Als Vergleichsgruppe dienten nicht-defiziente WT-Tiere.

Ein zweites Ziel der Arbeit bestand darin, $CD4^+$ T-Zellen bei der Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort funktionell zu charakterisieren. Für die Untersuchungen wurden *T.gondii*-resistente, CD4-depletierte Mäuse, die keine $CD4^+$ T-Zellen besitzen, eingesetzt. Es wurde überprüft, ob durch das Fehlen $CD4^+$ T-Zellen in *T.gondii*-resistenten, CD4-depletierten Mäusen die Induktion einer

1. *T.gondii*-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort
2. *T.gondii*-spezifischen B-Zellantwort
3. und Makrophagen- und Mikrogliaaktivierung

beeinträchtigt ist.

Neben *T.gondii*-resistenten Mäusen wurden *T.gondii*-suszeptible Mäuse wie MHC Kl. II defiziente Mäuse, denen konventionelle $CD4^+$ T-Zellen fehlen, und CD4-depletierte Mäuse in die Untersuchungen einbezogen. Dadurch konnte analysiert werden, ob das Fehlen $CD4^+$ T-Zellen die Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort in *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen im Vergleich zu *T.gondii*-resistenten Mäusen gleichermaßen beeinträchtigt. Darüber hinaus wurde überprüft, ob nicht-konventionelle $CD4^+$ T-Zelle in MHC Kl. II-defizienten Mäusen bei der murinen Toxoplasmose funktionell aktiv sind und zum Schutz gegen *T.gondii* beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ÄKTAprime	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
CO_2-Begasungsbrutschrank	Sanyo Biomedical, Bad Nenndorf
Elektrophoresekammer Mini-Protean®II	Bio-Rad, München
FACScan mit Cell Quest 3.3 Sofware	Becton-Dickinson, Heidelberg
Flurimeter, Fluoroscan II	Merlin, Bornheim-Hersel
Gamma-counter	Beckmann, München
Inversmikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
Kühlzentrifuge RS28	Heraeus, Hanau
Labormikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
Laborzentrifuge Rotana TRC	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer	Ikamag, Staufen
Microtom HM330	Mikrom, Hockenheim
Mini MACS Zell Seperations Apparat	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer-Zählkammer	Fisher, Schwerte
Inkubations Schüttelschrank, Certomat®	B. Braun Biotech int., Melsungen
Sonifier B-12, cell disrupter	Löffler, Wiesloch
Tischzentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge, Sorvall® Discovery™ 100SE	Kendro, Hanau
Ultrospec 1100 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Amicon® Ultra-4	Millipore, Schwalbach
Amicon® Ultra-15	Millipore, Schwalbach
Centriprep YM-30	Millipore, Schwalbach
Enzygnost Toxoplasmosis/IgG	DADE Behring, Marburg

Filterpapier	Sartorius, Göttingen
Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml, 650 ml)	Greiner, Frickenhausen
Gewebskulturplatten 96 well, Rundboden	Greiner, Frickenhausen
Glaskanüle zur Blutabnahme, 20 µl	Fisher, Schwerte
Hi-Trap ProteinG-Säule (5 ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon-P (IPVH), 96-well Filtrationsplatte	Millipore, Schwalbach
Kanüle zur oralen Infektion von Mäusen	Acufirm, Dreieich
Mikroliter^{Tm} Syringes	Hamilton-Bonaduz , Bonaduz, Schwiez
Mikrotiterplatten 96K, U-Form	Greiner, Frickenhausen
Quarzküvetten	Bender & Hobein, Ismanning
Sephadex® P-D10 Säulen, G25M	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex^{TM} 200 HiLoad^{Tm} 16/60	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spritzenvorsätze zur Filtration (0,2µm, 5,0µm)	Nalgene, Rochester USA
Spritzen und Nadeln zur Infektion	Becton-Dickinson, Heidelberg
Ultrafiltrationsrührzelle 8400	Millipore, Schwalbach
Ultrafiltrationsmembran (10 kD)	Millipore, Schwalbach
Zellsiebe, steril (0,1mm, 0,7mm Maschenweite)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen

2.1.3 Kits

Biotinylierungsreagenzien (Ligase Bir A)	Avidity, Denver, USA
Cytofix/Cytoperm Kit mit GolgiPlug	BD Bioscience, Heidelberg
MACS Cell Seperation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.4 Antikörper

Ratte anti-Maus CD1d-PE (Klon 1B1)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD4-PE (Klon G.K 1.5)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD4-FITC (Klon G.K 1.5) BD	BD Bioscience, Heidelberg

Ratte anti-Maus CD4-Cychrome (Klon RM4-5)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD8-PE (Klon 53-6.7)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD8-FITC (Klon 53-6.7)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD8-Cychrome (Klon 53-6.7)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD29-PE (Klon Ha2/5)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD44-PE (Klon Pgp-1, Ly-24)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD44-FITC (Klon IM7)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD45-Cychrome (Klon 30-F11)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD49d-FITC (Klon R1-2)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD62L-PE (Klon MEL-14)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD62L-FITC (Klon MEL-14)	BD Bioscience, Heidelberg
Purified anti-mouse CD16/32 (Klon 2.4G2)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus B220-FITC (Klon RA3-6B2)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus B7-2-PE (Klon GL1)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus F4/80 (Klon F4/80)	Biozol, Wiesbaden
Ratte anti-Maus Gr-1-PE (Klon RB6-8C5)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus H-2k^{d}-PE (Klon SF1-1.1)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus I-A/I-E-PE (Klon M5/114.15.2)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus IFN-γ-PE (Klon XMG1.2)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus IFN-γ Biotin (Klon XMG1.2)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus IFN-γ capture (Klon R4-6A2)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus IFN-γ (Klon RMMG-1)	Biosource, Solingen
Ziege anti-Maus IgG, Biotin Conjugate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
Ziege anti-Maus IgM, Biotin Conjugate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziege anti-Maus IgA, Biotin Conjugate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ratte anti-Maus Integrin β7-PE (Klon M293)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus LFA-1 (Klon FD441.8)	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus VCAM-1 (Klon M/K-2.7)	BD Bioscience, Heidelberg
Polyklonales Hase anti-*T.gondii* Antiserum	Biogenex, Duiven, Niederlande
IgG vom Rattenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Peroxidase Ziege anti-Ratte IgG F(ab`)$_2$	Dianova, Hamburg
Peroxidase Ziege anti-Hase IgG F(ab`)$_2$	Amersham-Pharmacia, Freiburg

2.1.5 Antikörper aus Zellkulturüberständen

Ratte anti-Maus CD4 (GK1.5)	ATCC, Manassas VA, USA

2.1.6 Chemikalien, immunologische und molekularbiologische Reagenzien

Amino-Ethylcarbazol (AEC)	Dianova, Hamburg
Attophos	Roche, Mannheim
IFN-γ recombinant protein (Zytokinstandart)	R&R Systems, Wiesbaden
Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München
DePeX-Eindeckmedium	Serva, Heidelberg
3,3-Diaminobenzidin	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG	BTS, Leon-Rot
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
NaCl, physiologisch	Delta-Pharma, Ingelheim
Peptid β-gal$_{876-884}$	Jerini, Berlin
Percoll®	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Peroxidase-conjugated Streptavidin	Dianova, Hamburg
Protein molecular weight marker, Broad Range	Bio-Rad, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Fluka, Neu-Ulm
Streptavidin-PE	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Tetramer-Reagenz, H-2K^d/β-gal $_{876-884}$-PE	eigene Herstellung
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude Niederlande
Trypanblau	Bio Whittaker, Walkersville MD
Trypsin	Invitrogen, Karslruhe
Waschlösung POD	DADE Behring, Marburg

Alle weiteren Chemikalien und immunologischen Reagenzien wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.7 Zelllinien

L929 (murine Fibroblasten)	ATCC, Manassas VA, USA
P815 (murine Mastzellen, H-2^d)	ATCC, Manassas VA, USA
HFF (humane Fibroblasten)	ATCC, Manassas VA, USA

CD1 transfizierte L-Zellen (Chen & Paul, 1997), wurden von Dr. M. Prout und Dr. G. LeGros aus Neuseeland zur Verfügung gestellt.

2.1.8 **Toxoplasma-*Stämme***

ME49 (schwach virulenter *Toxoplasma*-Stamm)

RH (hoch virulenter *Toxoplasma*-Stamm)

PruS1SPLACZ, β-Galaktosidase-transfizierter Prugniaud-Stamm (Kwok *et al*., 2003)

DX (schwach virulenter *Toxoplasma*-Stamm)

2.1.9 Maus-Stämme

Sv129 x C57BL/6 Zuchtpaare mit einer neonatalen Deletion des VCAM-1 Gens ($VCAM^{flox/flox\ MxCre}$; Leuker *et al.* 2001) sowie Sv129 x C57BL/6 Mäuse wurden von W. Müller aus Köln zur Verfügung gestellt.

MHC Kl. $II^{-/-}$-Zuchtpaare (B6-Aa^0/Aa^0, H-2^b; Köntgen *et al.*, 1993) wurden von H. Bluethmann (Roche, Basel) zur Verfügung gestellt. C57BL/6 (H-2^b), NMRI (Auszuchtstamm) und CB6-Mäuse (C57BL/6 x BALB/c, H-$2^{b/d}$) wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen) bezogen. Alle Versuchstiere waren 6-10 Wochen alt, weiblich und wurden unter pathogenfreien und konstanten Bedingungen (12h Tag/Nacht Rhythmus, 50-60% Luftfeuchtigkeit) im Tierstall gehalten.

2.1.10 Puffer, Lösungen und Medien

2.1.10.1 Puffer und Lösungen

Amino-Ethylcarbazol (AEC)-Lösung:
20 mg AEC in 2,5 ml Dimethylformamid
50 ml 50 mM Na-Acetatpuffer pH 5
mit einem Faltenfilter die Lösung filtrieren und kurz vor Gebrauch 25 µl 30% H_2O_2 zugeben.

Ammoniumchlorid-Erythrozytenlysepuffer (AKR):
0,15 M NH_4Cl
1 mM $KHCO_3$
0,1 mM Na_2EDTA (Tritriplex)
pH 7,2 – 7,4

Carbonat-Coatingpuffer:
0,015 M Na_2CO_3
0,035 M $NaHCO_3$
pH 9,6

Coomassi-blau Färbelösung:
0,25 g Coomassi Briliant blue R-250
90 ml 50% Methanol
10 ml 100% Essigsäure

Diaminobenzidin (DAB):
Stammlösung:
100 mg in 20 ml Tris-Puffer (0,05 M) lösen, filtrieren, und lichtgeschützt bei -20°C lagern; bei der Herstellung Mundschutz und Handschuhe tragen, da DAB toxisch ist

Gebrauchslösung:
100 µl DAB-Stammlösung
900 µl 0,05 M Tris-Puffer

EDTA, 0,5 M:
93,05 g EDTA in 300 ml A. dest. lösen, mit NaOH-Plätzchen auf pH 8 einstellen und auf 500 ml mit A. dest auffüllen

Faltungspuffer:
100 mM Tris-HCl
400 mM L-Arginin-HCl
2 mM NaEDTA
0,5 mM oxid. Glutathion
5 mM red. Glutathion pH 8,0

Guanidinlösung:
3 M Guanidin-HCl
10 mM Natriumacetat
10 mM NaEDTA pH 4,2

Lösungspuffer:	50 mM Tris HCl 25% Sucrose 1 mM NaEDTA 0,1% Natriumazid 10 mM DTT pH 8,0
Lysepuffer:	50 mM TisHCl 1% Triton X-100 0,1% Natriumdesoxycholat 100 mM NaCl 0,1% Natriumazid 10 mM DTT pH 8,0
MACS-Puffer:	0,1 M PBS 2% BSA 2 mM EDTA
PBS 0,1 M:	Lösung A: Natriumhydrogenphosphat 0,2 M Lösung B: di-Natriumhydrogenphosphat 0,2 M Lösung A wird zu Lösung B gegeben bis ein pH von 7,2 – 7,4 erreicht ist
Percoll® für Dichtegradienten:	
Percoll®-Stammlösung	1,122 g/ml (v/v) Percoll® + 10% (v/v) 1,5 M NaCl
Percoll®-Arbeitslösung	Percoll® 1,098 g/ml in HBSS (3%FCS) Percoll® 1,072 g/ml in HBSS (3%FCS) Percoll® 1,05 g/ml in HBSS (3%FCS) Percoll® 1,03 g/ml in HBSS (3%FCS) 1,0 g/ml in HBSS (3%FCS)
Tris-Puffer, 0,05 M:	60,8 g pH 7,6 mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen
Waschpuffer (ELISPOT):	0,1 M PBS 0,25 % Tween 20 (v/v)
Waschpuffer mit / ohneTriton:	50 mM Tris HCl 0,5% Triton X-100 100 mM NaCl 0,1% Natriumazid 10 mM DTT pH 8,0

2.1.10.2 Medien

HBSS wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Alle anderen Medien und Medienzusätze wurden der Firma PAA (Linz, Österreich) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Verwendung	Medium	Medienzusätze
Kultivierung von HFF-Zellen	DMEM High Glucose	10% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep
Kultivierung von CD1-transfizierten Zellen	RPMI 1640	10% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep, 0,2 mg/ml G418
Kultivierung von L929-Zellen	RPMI 1640	10% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep
Kultivierung von P815-Zellen	RPMI 1640	5% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep, 10mM HEPES
Kultivierung von Hybridomzellen	DMEM High Glucose	10% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep
Kultivierung von Leukozyten	MEM-α	10% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep, 10 mM HEPES
Chromierungsmedium (Chrom-release-Assay)	RPMI 1640	20% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep, 10 mM HEPES, 0,2% ME, 1 mM Glutamin
Zytotoxizitätsmedium (Chrom-release-Assay)	RPMI 1640	5% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep, 10 mM HEPES, 0,2% ME, 1 mM Glutamin
Waschen von Leukozyten	HBSS	3% FCS

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von VCAM-1

2.2.1.1 Infektion der Versuchstiere

$VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse (Sv129 x C57BL/6 Mäuse mit einer neonatalen Deletion des VCAM-1 Gens) und Sv x C57BL/6 Mäuse wurden mit jeweils 5 Zysten/0,5ml in 0,9% NaCl des schwach virulenten *Toxoplasma*-Stamms DX oral infiziert. Die Zysten wurden aus dem Gehirn chronisch-infizierter NMRI-Mäuse (Auszuchtstamm) 3-6 Monate nach deren Infektion gewonnen. Zunächst wurde das entnommene Gehirn in 2ml 0,9% NaCl homogenisiert und die Zysten unter dem Mikroskop gezählt. Anschließend wurde die Suspension mit 0,9% NaCl verdünnt und mittels einer Schlundsonde den Mäusen oral appliziert.

2.2.1.2 Herstellung von Toxoplasma-*Antigen: Heat-Killed*-Toxoplasma *(HKT)*

Für die *in vitro* Kultivierung von Tachyzoiten (RH Stamm) des Parasiten *T. gondii* wurden HFF-Zellen (humane Fibroblasten) als Wirtszellen verwendet. Als Kultivierungsmedium wurde DMEM (10% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep) eingesetzt. Nachdem ein Grossteil der Wirtszellen durch die Toxoplasmen lysiert war, wurde die Kultur zentrifugiert (50 x g, 5 min), um HFF-Zellen und Zelltrümmer von den Tachyzoiten zu trennen. Die Tachyzoiten-reichen Überstände wurden durch einen Spritzenfilter (Porengröße 5 µm) gegeben, um restliche Fibroblasten zu entfernen. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M PBS (400 x g, 20 min) wurden die Toxoplasmen mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt, zur Abtötung bei 65°C 20 min inkubiert und schließlich auf 1,5 x 10^7 Tachyzoiten/ml (Stammlösung) in sterilem 0,1 M PBS eingestellt. Die Endkonzentration betrug, wenn nicht anders beschrieben, 2x10^6 Tachyzoiten/ml. Die hitzegetöteten Toxoplasmen wurden bis zum Gebrauch bei -80°C eingefroren.

2.2.1.3 Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Leukozyten wurden aus Hirn und Milz nicht-infizierter und *T.gondii*-infizierter Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion isoliert.

2.2.1.3.1 Leukozytenisolation aus dem Hirn

Die Versuchstiere wurden zunächst mit Isofluran narkotisiert und anschließend intrakardial mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, um intravaskulare Leukozyten zu entfernen. Jeweils drei Hirne wurden durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gerieben, in 50 ml eiskaltem HBSS mit 3% FCS aufgefangen und zentrifugiert (1200 rmp, 6 min, 4°C). Hirnleukozyten wurden über einen Dichtegradienten aufgereinigt. Dazu wurde das Zellpellet in 10 ml 1,098 g/ml Percoll®-Lösung aufgenommen und mit 5 ml 1,12 g/ml Percoll®-Stammlösung unterschichtet. Dann wurde mit jeweils 10 ml einer Percoll®-Lösung der Dichte 1,072 g/ml, 1,05 g/ml, und 1,03 g/ml und mit 10 ml HBSS mit 3% FCS (1g/ml) überschichtet. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 1250 x g für 20 min bei RT (Anlaufzeit: 30 sec, Auslaufzeit: 5 min, ohne Bremse) wurden die zwei obersten Phasen des Gradienten verworfen. Die dritte, vierte und fünfte leukozytenhaltige Bande wurde separat

abgenommen, mit HBSS (3% FCS) gewaschen und in MEM-α aufgenommen. Die Leukozyten wurden gesammelt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.1.3.2 Leukozytenisolation aus der Milz

Die entnommenen Milzen wurden durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gerieben und die Milzzellen in 50 ml HBSS mit 3% FCS aufgefangen. Nach einer Zentrifugation (1200 rpm, 6 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 5 ml Ammoniumchlorid-Lysepuffer aufgenommen und für 5 min auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Die Zellsuspension wurde dann in HBSS (3% FCS) gewaschen, das Zellpellet in MEM-α aufgenommen und erneut über ein Zellsieb gegeben, um restliche Gewebepartikel zu entfernen. Die Leukozyten wurden mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und die Zellkonzentration eingestellt.

2.2.1.4 Serumgewinnung

Für die Detektion spezifischer Serum-Antikörper wurde das Blut aus nicht-infizierten und infizierten Mäusen am Tag 16 und 33 nach Infektion aus 5 Tieren pro Gruppe durch die Punktion des retroorbitalen Plexus entnommen, das Serum durch Zentrifugation (13000 g x, 20 min, 4°C) gewonnen und anschließend gepoolt. Bis zum Gebrauch wurde das Serum bei -80°C eingefroren.

2.2.1.5 Immunhistologie

Für den immunhistologischen Nachweis von *T.gondii* und VCAM-1 in infizierten und nicht-infizierten $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen und WT-Kontrolltieren wurde die indirekte Immunperoxidase-Methode eingesetzt.
Die mit Isofluran narkotisierten Versuchstiere wurden mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, die Organe entnommen (Milz, Leber, Lunge, Herz und Hirn), auf einem Filterplättchen in Tissue Tek OCT Compound® eingebettet und in trockeneisgekühltem Isopentan schockgefroren. Die Organe wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Für die Immunhistologie wurden von den schockgefrorenen Organen Kryostat-Schnitte auf silanbeschichteten Objektträgern (5-7µm) hergestellt. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurden die Schnitte mit Aceton (10 min) und Chloroform (7 min) zunächst fixiert und dann mit Ziegenserum (in 5% BSA in 0,1M PBS; 1:5 verdünnt) 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper über ihre FC-Region zu verhindern. Zur Detektion von *T.gondii* und VCAM-1 Antigenen wurde der Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Diaminobenzidin (DAB) wurde als chromogenes Substrat und H_2O_2 als Kosubstrat verwendet. Die Farbreaktion der Schnitte wurde später mit H_2O gestoppt.
Für die Gegenfärbung wurde Hämalaun, ein basischer Farbstoff zur blauen Anfärbung von Zellkernen, verwendet. Die Objektträger wurden mit Mayer`s Hämalaun (1:2 in A.dest.) 10sec inkubiert, dann für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült und zur Entwässerung mit Isopropanol (50%, 70%, 90%) für jeweils eine Minute und mit Xylol für zwei Mal 5 min behandelt und schließlich mit DePeX eingedeckt

2.2.1.6 Durchflusszytometrie

Intra- und extrazelluläre Antigene der Milz- und Hirnleukozyten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Für die Untersuchung wurden jeweils $0{,}5x10^6$ bis $1x10^6$ Zellen und 1µg Antikörper in 0,1 M PBS mit Maus IgG (30 µg/ml) pro $1x10^6$ Zellen eingesetzt. Zunächst wurden die FC-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Leukozyten mit Ratte anti-Maus CD16/32 (FC Block^{Tm}) geblockt (4°C, 10 min), um unspezifische Bindungen der Antikörper über ihre FC-Region zu verhindern. Die Leukozyten wurden dann, wenn nicht anders beschrieben, für 20 min bei 4°C mit einem Fluoreszenzfarbstoff (PE, FITC oder Cychrome) gekoppelten Antigen-spezifischen Antikörper der Firma Becton-Dickinson (BD) inkubiert (20 min, 4°C) und anschließend mit 2 ml 0,1 M PBS gewaschen (1200 rpm, 6 min, 4°C). Die Zellen wurden in einem Durchflusszytometer der Firma BD untersucht. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm Cell Quest (BD).

2.2.1.6.1 Rekrutierung und Aktivierung der Leukozyten in VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen

Um die Rekrutierung der Leukozyten in das Gehirn in VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen und WT-Tieren durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden zerebrale Leukozyten durch eine zweifache oder dreifache Fluoreszenzfärbung nachgewiesen. $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurden mit anti-CD4-FITC oder anti-CD8-FITC und zusätzlich mit anti-CD44PE, anti-CD62L-PE oder anti-LFA-1-PE angefärbt, um den Aktivierungsstatus der T-Zellen zu bestimmen.
B-Zellen wurden mit Hilfe von anti-B220-FITC und anti-CD45-Cychrome ermittelt. Zur Detektion von Granulozyten wurde anti-GR-1-PE, anti-F4/80-FITC und anti-CD45-Cychrome verwendet. Granulozyten wurden als GR-1^+ $CD45^+$ und F4/80^- definiert. Murine Makrophagen und Mikroglia wurden durch die Anfärbung mit anti-CD45-Cychrome und anti-F4/80-FITC bestimmt. Da Makrophagen im Vergleich zur Mikroglia CD45 verstärkt exprimieren, lassen sich Makrophagen und Mikroglia als getrennte Zellpopulationen identifizieren. Die Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia wurde über die MHC Kl. I und II-Expression durch die Verwendung von anti-MHC Kl. I-PE und anti-MHC Kl. II-PE bestimmt. Um die Expression der VCAM-1 Liganden CD49d/CD29 ($\alpha4\beta1$ Integrin) und CD49d/Integrin$\beta7$ ($\alpha4\beta7$ Integrin) auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu ermitteln, wurden zerebrale Leukozyten mit anti-CD4-Cychrome und anti-CD8-Cychrome in Kombination mit anti-CD29-PE und anti-CD49d-FITC oder anti-Integrin$\beta7$-PE und anti-CD49d-FITC angefärbt. Kontrollfärbungen wurden den Isotypen der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern entsprechend durchgeführt.

2.2.1.7 Nachweis **T.gondii-***spezifischer Antikörper im Serum mittels ELISA*

Anti-*T.gondii* IgG und IgM Antikörper des Serums von *T.gondii*-infizierten und nicht-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MXCre}$ Mäusen und WT-Tieren wurden mittels ELISA (Enzyme-linked- immunosorbent-assay) untersucht. Für die Detektion der *T. gondii*-spezifischen Antikörper wurden mit *T. gondii*-Antigen beschichtete Mikrotiterplatten der Firma DADE Behring eingesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden zunächst mit 5% FCS-haltigem Waschpuffer (DADE Behring, 200µl/well) für 1 h bei 37°C inkubiert, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden die Platten vier Mal mit Waschpuffer (DADE Behring) gewaschen (200 µl/well) und die in 0,1 M PBS mit 10% FCS

verdünnten Seren (10^{-1} - 10^{-6}) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h bei 37°C. Die Platten wurden erneut vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und biotinylierte anti-Maus IgG oder IgM-Sekundärantikörper zugegeben (2 µg/ml in Waschpuffer mit 5% FCS und 0,2% Tween). Nach einer Inkubation von 1,5 h bei RT und sechsmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde an Extraavidin gekoppelte Alkalische-Phosphatase zugegeben (1:4000 in Waschpuffer mit 5% FCS) und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Waschgang wurde das chromogene Substrat (AttoPhos von Roche, 100 µl/well) aufgetragen und die Platten für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden in einem ELISA-Reader (Fluoroskan II, Filter 6/6 ex444nm/em555nm) gemessen.

2.2.1.8 ELISPOT (Enzyme-linked immunospot assay)

Die Frequenz *T. gondii*-spezifischer T-Zellen der Milz und des Hirns von *T. gondii*-infizierten (d33) und nicht-infizierten Tieren wurde mit Hilfe des IFN-γ ELISPOT Verfahrens ermittelt, mit dem sich IFN-γ-sezernierende T-Zellen nachweisen lassen. Dazu wurden 96-well Elispotplatten (Immobilon-P (IPVH) Filtrationsplatte, Millipore) mit einem anti-Maus IFN-γ Antikörper beschichtet (10 µg/ml in Carbonat-Coating-Puffer; 65 µl/well) und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen (200 µl A. dest/well; 15 min Einwirkzeit) wurde die Platte mit 10% FCS in MEM-α (50 µl/well) behandelt und 1 h bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungen des Zytokins zu vermeiden. Isolierte Milz- und Hirnzellen wurden in MEM-α aufgenommen, anschließend auf die Platte als Triplikat pipettiert ($4x10^5$/well) und mit HKT (2 Parasiten/5 Leukozyten) und ohne HKT ÜN bei 37°C restimuliert. Die Platte wurde 10 Mal mit Waschpuffer (0,1 M PBS 0,25% Tween20) gewaschen, der Biotin-gekoppelte 2. Antikörper (Anti-Maus IFN-γ; 1µg/ml) zugegeben und die Platte für 2h bei RT inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen und das Peroxidase-Streptavidin Konjugat zugefügt (1:250 in 5% FCS-haltigem Waschpuffer; 50 µl/well). Nach 2h bei RT wurde die Platte gewaschen und 50 µl des Substrats (AEC in DMF) pro well zugegeben. Danach wurde die Reaktion nach 15 min mit A.dest gestoppt. Die Frequenz IFN-γ produzierender Antigen-spezifischer Zellen wurde durch das mikroskopische Auszählen der Punkte (Spots) bestimmt und HKT-stimulierte und nicht- stimulierte Zellen voneinander subtrahiert.

2.2.1.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde der Student t-Test eingesetzt. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bewertet, die $p < 0.05$ waren.

2.2.2 Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung $CD4^+$ T-Zellen

2.2.2.1 Infektion der Versuchstiere

CB6-Mäuse wurden mit dem β-Galaktosidase-exprimierenden *Toxoplasma*-Stamm PruS1SPLACZ oral infiziert (2 Zysten/Maus in 500µl 0,9% NaCl).
CD4-depletierte C57BL/6 (WT) Mäuse, MHC Kl. II-defiziente Mäuse und C57BL/6 (WT)-Kontrolltiere wurden mit Zysten (5 Zysten/Maus in 500µl 0,9% NaCl) des schwach-virulenten *Toxoplasma*-Stamms ME49 intraperitoneal infiziert.

2.2.2.2 Antikörpergewinnung

Zur Herstellung von anti-CD4 Antikörpern wurde die Hybridomzelllinie GK1.5 (ATCC, Manassas VA, USA) in DMEM Medium (10% FCS, 10 µg/ml Pen/Strep) kultiviert und die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände einmal wöchentlich geerntet (2900 rpm, 10°C, 15 min). Die Antikörper wurden über eine Protein G-Sepharose-Säule mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Protein G, ein Zelloberflächenprotein von Streptokokken der Serogruppe G mit Fc-Rezeptorfunktion, bindet IgG-Antikörper über ihre Fc-Region durch einen nicht-immunologischen, pH-abhängigen Mechanismus. Für die Proteinaufreinigung wurde das Gerät ÄKTAprime der Firma Amersham Pharmacia Biotech nach den Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Antikörperaufreinigung wurde in einem zweiten Schritt der Puffer des gesammelten antikörperhaltigen Eluats mit Hilfe einer Sephadex® PD10 Säule durch 0,01 M PBS ausgetauscht und in Centriprep 30 Konzentratoren durch Zentrifugation (1300 x g, 15 min) aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Protein Assay der Firma BioRad bestimmt. Abschließend wurden die Antikörper auf 2,5 mg/ml in 0,01 M PBS verdünnt, steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.2.3 Depletion von CD4$^+$ T-Zellen

Zur Depletion von CD4$^+$ T-Zellen wurde CB6-Mäusen sowie MHC Kl. II-defizienten und C57BL/6-Mäusen zunächst an drei aufeinander folgenden Tagen vor Infektion 0,5 mg anti-CD4 (Klon GK1.5) i.p. injiziert. Nach Infektion wurde die Depletion alle 3-4 Tage bis zum Versuchsende fortgesetzt. Kontrolltiere erhielten gleiche Mengen Ratten IgG der Firma Sigma. Der Erfolg der Depletion wurde durchflusszytometrisch überprüft.

2.2.2.4 Serum- und Liquorgewinnung

Blutserum wurde sowohl aus nicht-infizierten und infizierten CD4-depletierten CB6-Mäusen und Kontrolltieren (d15 und 25) als auch aus MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten C57BL/6-(WT) Mäusen und WT-Tieren (d15 und 25) gewonnen (zur Versuchsbeschreibung siehe 2.2.1.4).
Liquor wurde aus nicht-infizierten und infizierten (Tag 15 und 25) CD4-depletierten CB6-Mäusen und WT-Tieren, durch die Punktion der Cisterna magna, gewonnen. Zur Punktion perfundierter Tiere wurden feine Glaskapillaren verwendet. Pro Maus wurden ca. 7µl Liquor isoliert, die anschließend pro Gruppe gepoolt wurden.

2.2.2.5 Herstellung der MHC Kl. I-Tetramere

Die Technik wurde von Altman *et al*., 1996 entwickelt und ermöglicht eine direkte *ex vivo* Detektion Antigen-spezifischer T-Zellen. Das MHC Kl. I-Tetramer besteht aus vier biotinylierten MHC Kl. I-Molekülen, die ein Peptid gebunden haben und über Biotin an einem Streptavidin verankert sind. Zusätzlich ist dieser Komplex an den Fluoreszenzfarbstoff PE gekoppelt. So lassen sich Peptid-spezifische CD8$^+$ T-Zellen, die über ihren TCR an das MHC Kl. I-Tetramer binden, durchflusszytometrisch nachweisen (Abb. 2.1).
In den folgenden Abschnitten sind die Kernelemente der Methode zusammengefasst. Das Protokoll zur Herstellung der MHC Kl. I-Tetramere wurde von PD Dr. med. Dirk Busch (Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, München) übernommen und ist ausführlich im Internet unter www. med.tum.de beschrieben.

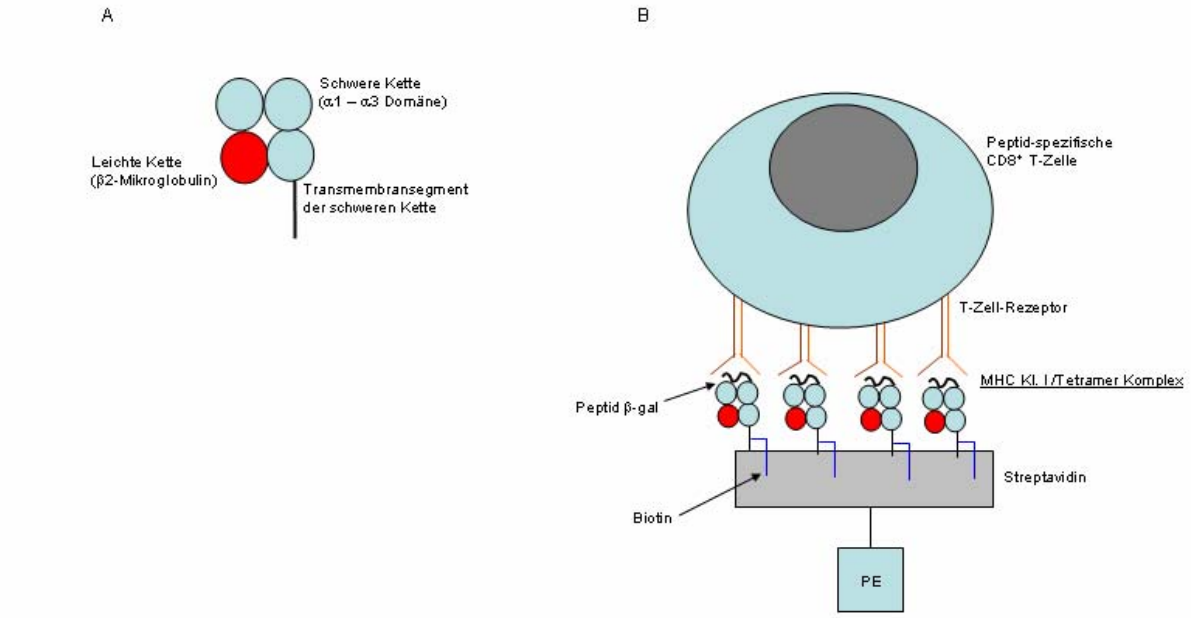


Abb. 2.1 Die Tetramerfärbung. Die Abbildung A zeigt den schematischen Aufbau eines MHC Kl. I-Moleküls. Die a-Kette besitzt drei extrazelluläre Domänen (a1 – a3) sowie ein Transmembransegment. Das konstante b2-Mikroglobulin steht mit der a3-Domäne in Wechselwirkung. Abbildung B zeigt schematisch die Interaktion zwischen einer Peptid-spezifischen T-Zelle und dem MHC Kl. I/Tetramerkomplex. Vier MHC Kl. I-Moleküle sind jeweils über ein Biotin an ein Streptavidin verankert. Das Streptavidin ist an den Fluoreszenzfarbstoff PE gekoppelt. Binden Antigen-spezifische CD8 + T-Zellen über den T-Zellrezeptor an den MHC Kl. I/Tetramer-Komplex, lassen sie sich durchflusszytometrisch auf Peptid-Ebene nachweisen.

2.2.2.5.1 Herstellung rekombinanter Proteine

Für die Herstellung rekombinanter Proteine wurden Bakterienstämme (BL21(DE3)) verwendet, die IPTG-abhängig die schwere Kette (HC, H2-L^d) und das murine β2-Mikroglobulin (mβ2-M) überexprimieren. Die Bakterienstämme wurden uns von PD Dr. med. Busch zur Verfügung gestellt.

Die Bakterien wurden in LB-Medium (40% Glukose) bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Dem Medium wurde zuvor Carbenicillin (100µg/ml, HC-exprimierende-Bakterien) oder Ampicillin (50µg/ml, mβ2-M-exprimierende Bakterien) zugesetzt. Wenn die Kulturen eine Optische Dichte (OD_{540}) von 0,7 erreicht hatten, wurde durch Zugabe von IPTG (0,4 mM) die Bildung der Proteine induziert. Nach 3 h bei 37°C wurden die Bakterien geerntet (2,000 x g, 20 min 4°C). Die Proteinexpression wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (10% SDS-Page) überprüft. Zur Detektion der Proteinbanden wurde Coomassie-blau eingesetzt.

Das Pellet aus einem Liter Bakterienkultur wurde in 15 ml Lösungspuffer aufgenommen. Die Bakterienlyse erfolgte durch die Zugabe von Lysozym und Lysepuffer, durch das Einfrieren und Auftauen und durch wiederholtes homogenisieren der Bakterienlösung mit Hilfe des Sonikators. Zwischen den Homogenisierungsschritten wurde die Lösung zentrifugiert (11,000 x , 20 min, 4°C) und erst in Waschpuffer mit Triton und schließlich in Waschpuffer ohne Triton aufgenommen. Nach einer letzten Zentrifugation wurde das Pellet in hochmolarem Harnstoff (8 M Harnstoff, 25 mM MES, 10mM NaEDTA, 0,1 mM DTT) über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst, da die Proteine sonst als unlösliches Präzipitat ausfallen würden. Nach einer Ultrazentrifugation (45.000 rpm, 20 min, 20°C) wurden die proteinhaltigen Überstande bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Um den Reinheitsgrad der Proteine zu überprüfen, wurden diese vorher mit der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Coomassi-blau angefärbt. Die Konzentration der schweren Kette und des β2-Mikroglobulins wurden mit Hilfe des Protein Assays der Firma Biorad ermittelt.

2.2.2.5.2 Die Faltung des MHC Kl. I/Peptid-Komplexes

Es wurden 6,6 mg der schweren Kette (H2-L^d) und 4,4 mg β2-Mikroglobulin für jede Faltung der insgesamt drei Ansätze eingesetzt. Zunächst wurden 12 mg des H2-L^d-abhängigen und CD8-dominaten Peptids β-$gal_{876-884}$ (Rammensee *et al*., 1989) im Faltungspuffer (200 ml) auf

dem Magnetrührer bei 4°C gelöst. Dem Faltungspuffer wurden vorher Proteaseinhibitoren zugesetzt (1mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF), 2µg/ml Pepstatin, 2µg/ml Leupeptin), um die Biotinylierungsstelle der schweren Kette zu schützen, welche bevorzugt von Proteasen während des Faltungsprozesses angegriffen wird. Anschließend wurden die Proteine jeweils mit Guanidinlösung verdünnt und erst das β2-Mikroglobulin (4,4 mg) und dann die schwere Kette (6,6 mg) unter Rühren tropfenweise in den Faltungspuffer hinzugefügt. Dabei ist es wichtig, die schwere Kette zum Schluss dazu zugegeben, da das Protein, wenn es nicht im Komplex gebunden ist, sehr instabil ist und ausfällt. Nach 8h bei 4°C wurden die zweiten Proben der schweren Kette und des β2-Mikroglobulin zugegeben und für weitere 6 – 12h bei 4°C gerührt. Schließlich wurden die dritten Proben hinzugefügt und für 24h bei 4°C unter ständigem Rühren inkubiert. Nach der Proteinfaltung wurde die Proteinlösung zentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C), um unlösliche Präzipitate zu entfernen. Für die folgende Ankonzentrierung und den Pufferaustausch wurde die Ultrafiltrationsrührzelle und die Ultrafiltrationsmembran (10 kD) der Firma Bio-Rad nach den Angaben des Herstellers verwendet und die Proteinlösung (200 ml) in 10 ml FPLC-Puffer (20 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, pH8) ankonzentriert. Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm) und mit Hilfe des Amicon® Ultra-15 Filtersystems zur weiteren Ankonzentrierung zentrifugiert (30 - 60 min, 3000 rpm, 4°C), bis sich das Volumen auf 700 µl reduziert hatte.

2.2.2.5.3 Die Biotinylierung

Die schwere Kette wurde als Fusionsprotein exprimiert und enthält eine spezifische Biotinylierungsstelle am C-Terminus des Proteins. Daher war es möglich, mit Hilfe der Ligase Bir A und unter Zugabe von ATP sowie Biotin, die MHC Kl. I/Peptid-Komplexe über Nacht bei RT *in vitro* zu biotinylieren. Für die Biotinylierung wurden die Reagenzien der Firma Avidity nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Aufreinigung der MHC Kl. I/Peptid-Monomere erfolgte mittels Gelfiltration bei 4°C, um ungebundenes Biotin sowie denaturierte Proteine zu entfernen. Dazu wurde das Gerät ÄKTAprime der Firma Amersham Pharmacia Biotech, wie vom Hersteller beschrieben, verwendet. Als Säule wurde die Gelfiltrationssäule Superdex™ 200 HiLoad™ 16/60 eingesetzt und die Proben in 2 ml Portionen fraktioniert. Die positiven Fraktionen wurden gesammelt, gepoolt und die MHC Kl. I/Peptid-Komplexe mit dem Amicon® Ultra-15 Filtersystem ankonzentriert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des Protein Assays der Firma Bio-Rad. Um die

Effizienz der *in vitro* Biotinylierung zu überprüfen, wurde ein Teil des biotinylierten MHC Kl. I/Peptid-Komplexes für einen Shift-Assay eingesetzt. Hierzu wurde Avidin (5mg/ml), welches Biotin bindet, der Firma Pierce zum Komplexgemisch dazugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Probe wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel (15%) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassi-blau angefärbt. Im Vergleich zur ungebundenen Proteinprobe (45kD) zeigten Biotin-MHC Kl. I/Peptid-Komplexe, welche Avidin gebunden hatten, im Gel einen „Shift" (100kD).

2.2.2.5.4 Multimerisierung der MHC Kl. I/Peptid-Komplexe

Für die Tetramerisierung der MHC Kl. I/Peptid-Monomere wurde Streptavidin, welches vier Biotin-Bindungsstellen besitzt, verwendet. Da das Streptavidin mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE konjugiert war, konnte das MHC Kl. I/Tetramer Reagenz später für durchflusszytometrische Untersuchungen eingesetzt werden. Die Menge des für die Tetramerisierung einzusetzenden Streptavidins wurde über das molekulare Gewicht errechnet (MHC Kl. I/Peptid-Komplex 45,000 g/M, Streptavidin-PE 300,000g/M) und Streptavidin-PE in einem molekularen Verhältnis von 1:4 eingesetzt. Streptavidin-PE wurde in 50 µl Fraktionen alle 15 min zum MHC Kl. I/Peptid-Gemisch zugegeben und über Nacht bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Der Puffer der Peptidlösung wurde gegen PBS-Puffer (0,1 M, pH 8,0) über einen Amicon® Ultra-4 Filter ausgetauscht und die Lösung mit PBS gewaschen. Abschließend wurde der Lösung 1µg/ml Pepstatin, 1µg/ml Leupeptin, 0,5mM EDTA und 0,02% Natriumazid zugesetzt, die Konzentration der MHC Kl. I-Tetramere auf 2 mg/ml eingestellt und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.2.6 Durchflusszytometrie

2.2.2.6.1 Phänotypische Charakterisierung der Milz-und Hirnleukozyten

Milz- und Hirnzellen wurden aus nicht-infizierten und *T.gondii*-infizierten CD4-depletierten und nicht-depletierten CB6-Mäusen isoliert und $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Mikroglia und Granulozyten durchflusszytometrisch nachgewiesen (zur Versuchsbeschreibung siehe 2.2.1.6.1).

2.2.2.6.2 Tetramer-Assay zur Detektion Antigen-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen und Bestimmung des Aktivierungsstatus Tetramer-positiver Zellen

Zur Detetekion Antigen-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen in *T.gondii*-infizierten Mäusen wurden MHC Kl. I-Tetramere eingesetzt. Um βgal$_{876-884}$-spezifische CD8$^+$ T-Zellen zu untersuchen, wurden die Versuchstiere mit einem β-Galactosidase exprimierenden *Toxoplasma*-Stamm (PruS1SPLACZ) i.p. infiziert und die Lymphozyten aus Milz und Hirn am Tag 15 und 25 isoliert. Zur Ermittlung der Frequenz von Peptid-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen wurden die Zellen mit dem Tetramer-Reagenz (H-2K^b/β -gal $_{876-884}$-PE) und CD8-FITC angefärbt und 1h bei 4° inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurde für die Anfärbung das Tetramer-Reagenz (H-2K^b/β -gal $_{876-884}$-PE), anti-CD8-Cychrome und anti-CD44-FITC oder CD62L-FITC eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert.

2.2.2.6.3 Nachweis der IFN-γ und TNF-α Produktion von Antigen-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen

Um die funktionelle Aktivität von βgal$_{876-884}$-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen aus *T. gondii* (PruS1SPLACZ) infizierten CD4-depletierten CB6-Mäusen und nicht-depletierten Kontrolltieren zu analysieren, wurden die Lymphozyten aus Milz und Hirn zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. Die Zellen wurden dann mit dem Peptid β-gal$_{876-884}$ (10^{-7} M) und Golgi-Plug (1 µl/ml, Cytofix/Cytoperm-Kit von BD), welches den Proteintransportinhibitor Brefeldin A enthält und zur intrazellulären Anreicherung des Zytokins führt, für 3 h bei 37°C in MEM-α inkubiert.

Für die Bestimmung der funktionellen Aktivität *T.gondii*-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen in CD4-depletierten C57BL/6-Mäusen, MHC Kl. II-defizienten Mäusen sowie WT-Kontrolltieren wurden die Hirn- und Milzzellen aus ME49 infizierten und nicht-infizierten Versuchstieren isoliert

und wie oben beschrieben behandelt. Als Antigen diente HKT .

Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD8-FITC angefärbt. Für die intrazelluläre Anfärbung von IFN-γ bzw. TNF-α wurde der Cytofix/Cytoperm-Kit der Firma BD nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Zellen wurden mit der Cytofix/Cytoperm-Lösung permeabilisiert und fixiert, um intrazelluläres IFN-γ mit anti-IFN-γ-PE oder intrazelluläres

TNF-α mit anti-TNF-α-PE anzufärben. Abschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung der IFN-γ und TNF-α Produktion Antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen.

2.2.2.6.4 Nachweis der TNF-α Produktion und MHC Kl. II-Expression von Makrophagen und Mikroglia

Zur Identifizierung der Makrophagen und Mikroglia wurden die Leukozyten der Milz und des Hirns aus nicht-infizierten und *T.gondii*-infizierten CD4-depletierten und nicht-depletierten CB6-Mäusen isoliert und mit anti-MAC-1-FITC und anti-CD45-Cychrome angefärbt. Um die Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia nachzuweisen, wurde die intrazelluläre TNF-α Produktion (zur Versuchsbeschreibung siehe 2.2.2.6.3) und die MHC Kl. II-Expression ermittelt. Zur Bestimmung der MHC Kl. II-Expression wurden die Zellen zusätzlich mit Anti-IA/IE-PE angefärbt.

2.2.2.7 Immunomagnetische Separation $CD4^+$ T-Zellen

Für die Anreicherung von $CD4^+$ T-Zellen in MHC Kl. II-defizienten Mäusen sowie WT-Kontrolltieren wurde das Mini-MACS-System (Magnetic-Antibody-Cell-Sorting) der Firma Miltenyi genutzt. Als Antikörper wurde anti-CD4-FITC (20 µl/1x10^8 Zellen) verwendet, da im Vergleich zu PE-gekoppelten Antikörpern hier eine höhere Reinheit erzielt wurde. Das MACS-System wurde wie vom Hersteller beschrieben eingesetzt.

2.2.2.8 Nachweis **T.gondii-***spezifischer Antikörper mittels ELISA*

Anti-*T.gondii* IgG, IgM und IgA Antikörper des Serums und Anti-*T.gondii* IgG, IgM des Liqours aus infizierten und nicht-infizierten CD4-depletierten CB6 und WT-Mäusen wurden am Tag 0, 15 und 25 nach Infektion analysiert. *T. gondii*-spezifische IgG, IgM und IgA Serumantikörper von MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten C57BL/6 (WT)-Mäusen und WT-Kontrolltieren wurden am Tag 0, 15 und 30 nach Infektion untersucht. Spezifische Antiköprer wurden mittels ELISA nachgewiesen (siehe dazu auch 2.2.1.7).

2.2.2.9 Nachweis der IFN-γ Produktion nicht-konventioneller CD4$^+$ T-Zellen in MHC Kl. II-defizienten Mäusen mittels ELISA

Die CD1-Restriktion CD4$^+$ T-Zellen von *T.gondii* infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen wurde über die IFN-γ Produktion mittels ELISA untersucht. Dazu wurden zunächst CD4$^+$ T Zellen (Effektorzellen) der Milz aus infizierten und nicht-infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Kontrolltieren über das MACS-System angereichert, in MEM-α complete aufgenommen und in eine Mikrotiterplatte (1x10^5 Zellen/well) pipettiert. Antigenpräsentierende Zellen (APZ) waren CD1-transfizierte L-Zellen (0,5x10^5 Zellen/well) und nicht-transfizierte L-Zellen (0,5x10^5 Zellen/well, Negativkontrolle), die zu den Effektorzellen als Triplikat pipettiert wurden. Als Antigen diente HKT (2x10^6 Toxoplasmen/ml). Außerdem wurden CD4$^+$ T-Zellen zur Kontrolle ohne Antigen behandelt oder mit Concanavallin A (ConA, 5µg/ml), einem polyklonalem Mitogen, stimuliert. Die Zellen wurden 72 h bei 37°C inkubiert und die Zellüberstände geerntet (1200 rpm, 5 min).
Für die Bestimmung des Zytokingehalts im Sandwich-ELISA wurden Mikrotiterplatten mit anti-IFN-γ beschichtet (0,5 µg/ml in Coating-Puffer, 100µl/well) und ÜN bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen (200 µl/well) mit Waschpuffer der Firma DADE Behring wurden die Platten mit 5% FCS-haltigem Waschpuffer (100 µl/well) Ü.N. bei 4°C gelagert und anschließend vier Mal mit Waschpuffer gewaschen. Die in Waschpuffer mit 10% FCS verdünnten Überstände sowie der Zytokinstandard wurden in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C und einem weiteren Waschgang wurde der biotinylierte zweite Antikörper in die wells gegeben (anti-IFN-γ, 2 µg/ml in Waschpuffer mit 10% FCS und 0,2% Tween) und für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde dann sechs Mal mit Waschpuffer gewaschen. Die an Extraavidin gekoppelte Alkalische-Phosphatase wurde zugegeben, die Platte gewaschen, das chromogene Substrat aufgetragen und die Proben gemessen (siehe für eine detaillierte Versuchsbeschreibung 2.2.1.6).

2.2.2.10 Zytotoxizitätstest (Chrom-release-assay)

Die Aktivität zytotoxischer CD8$^+$ T-Zellen aus Milz und Hirn von *T.gondii*-infizierten CD4-depletierten CB6-Mäusen und WT-Tieren wurde mit dem Chrom-release-assay nachgewiesen. Als antigenpräsentierende Targetzellen wurden P815 (H-2^d) verwendet, die

vor der Markierung mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr, 100 µCi/1x10^6 Zellen, 1 h bei 37°C in Chromierungsmedium) zunächst mit dem Peptid β-gal $_{876-884}$ (10^{-7} M) in MEM-α beladen wurden (3 h, 37°C). Als Kontrolle dienten nicht-Peptid beladene APZ. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit Zytotoxizitätsmedium gewaschen (2 min 3000rpm), das Zellpellet in Zytotoxizitätsmedium aufgenommen (2x10^4 Zellen/ml) und jeweils 10^3 Zellen pro well in eine Mikrotiterplatte gegeben. Die Leukozyten aus *T. gondii*-(PruS1SPLACZ) infizierten Versuchstieren wurden aus Milz und Hirn isoliert, in Zytotoxizitätsmedium aufgenommen und zu den Targetzellen in einem Effektor/Target-Verhältnis von 200:1, 100:1, 30:1, 10:1, 30:1 und 1:1 als Triplikate pipettiert. Zusätzlich wurde in 10 wells ausschließlich Targetzellen gegeben (Kontroll-wells). Nach 5 h bei 37°C wurden die Überstände geerntet (1200 rpm 5 min, 100 µl pro well). Dabei wurden in 5 der 10 Kontroll-wells die Zellen zuvor durch Pipettieren durchmischt, um den maximalen Wert des pro 10^3 Zellen inkorporierten radioaktiven Chroms zu ermitteln. Die anderen 5 Kontroll-wells dienten zur Ermittlung des spontan freigesetzten Chroms (Background). Das freigesetzte ^{51}Cr wurde in einem Gamma-Counter gemessen und die spezifische Lyse nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{cpm Probe - cpm Background}}{\text{cpm Maximum - cpm Background}} \times 100 = \text{\% spezifische Lyse}$$

2.2.2.11 Antikörpertransfer – Serotherapie

Zur Gewinnung von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern wurde am Tag 20 und 30 nach Toxoplasma-Infektion das Blut aus jeweils 15 *T.gondii*-infizierten CB6-Mäusen bzw. 15 *T.gondii*-infizierten C57BL/6-Mäusen pro Zeitpunkt entnommen, gepoolt und das Serum, gewonnen (siehe dazu 2.2.1.4). Für den Antikörpertransfer wurde CD4-depletierten CB6-Mäusen sowie MHC Kl. II-defizienten Mäusen vom Tag 7 bis zum Tag 49 nach Infektion wöchentlich 200µl des entsprechenden Immunserums i.v. injiziert. Kontrollgruppe waren MHC Kl. II-defiziente Mäuse, die die gleiche Menge Serum, welches zuvor aus nicht-infizierten WT-Tieren gewonnen wurde, erhielten (nicht-Immunserum). Zusätzlich wurden infizierte CD4-depletierte und nicht-depletierte CB6-Mäuse sowie infizierte MHC Kl. II-defiziente Mäuse und WT-Tiere auf gleiche Weise mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

2.2.2.12 Immunhistologie

Für den immunhistologischen Nachweis von *T.gondii* in infizierten und nicht-infizierten CD4-depletierten CB6-Mäusen und CB6 (WT)-Tieren sowie in MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten C57BL/6 (WT)-Mäusen und nicht-depletierten WT-Tieren wurde die indirekte Immunperoxidase-Methode eingesetzt (zur Beschreibung der Methode siehe 2.2.1.5).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 bei der *Toxoplasma*-Enzephalitis

3.1.1 VCAM-1 Expression im Hirn von T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten* $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ *und* $VCAM^{flox/flox}$ *(WT) Mäusen*

Erst kürzlich wurden konditionale VCAM-1-mutante Mäuse ($VCAM^{flox/flox\ MxCre}$) entwickelt, in denen das VCAM-1 Gen durch eine IFN-α induzierbare Cre-loxP-abhängige Deletion neonatal ausgeschaltet wird (Leuker *et al*., 2001). Diese konditionalen VCAM-1-mutanten Mäuse wurden verwendet, um die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 erstmals *in vivo* bei einer Infektion, nämlich der *Toxoplasma*-Enzephalitis (TE), zu untersuchen. Im Gegensatz zu anderen Organen, wird das VCAM-1 Gen im Gehirn durch eine IFN-α-abhängige Rekombination nur unvollständig ausgeschaltet, da IFN-α aufgrund der Blut-Hirn-Schranke wahrscheinlich nur bedingt in das Gehirn eintreten kann (Leuker *et al*., 2001). Die Expression und Lokalisation von VCAM-1 im Gehirn von *T.gondii*-infizierten und nicht-infizierten $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen und $VCAM^{flox/flox}$ Kontrolltieren wurde daher in der vorliegenden Arbeit immunhistologisch genauer analysiert. Wie vorangegangene Untersuchungen bestätigen (Deckert-Schlüter *et al*., 1994), wurde in $VCAM^{flox/flox}$ Kontrolltieren sowie in $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen VCAM-1 auf den Epithelzellen des Plexus choroideus sowie auf den Ependymzellen der Ventrikel konstitutiv exprimiert (Abb. 3.1 a, b). Im nicht-infizierten Tier wurde VCAM-1 auf den Endothelzellen zerebraler Blutgefäßen von WT-Mäusen nur teilweise und schwach exprimiert (Abb. 3.1c, Pfeil). Im Gegensatz zu WT-Mäusen exprimierten $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse kein VCAM-1 auf den Endothelzellen zerebraler Blutgefäße (Abb. 3.1 d). Nach einer *T-gondii*-Infektion wiesen WT-Tiere auf den Endothelzellen zerebraler Blutgefäße eine starke Induktion der VCAM-1 Expression auf, während $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse kein VCAM-1 exprimierten (Abb. 3.1 e, f). Zerebrale Blutgefäße von *T.gondii*-infizierten WT-Mäusen waren teilweise von perivaskulären Leukozyten umgeben (Abb. 3.1 e).

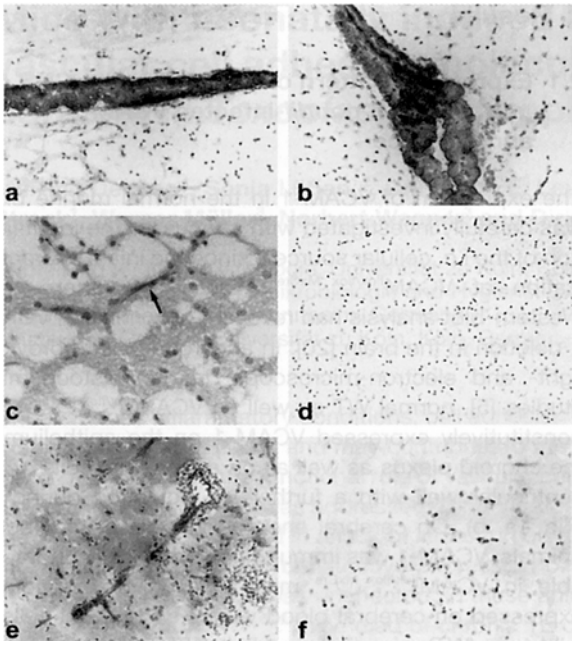


Abb. 3.1 VCAM-1 Expression im Hirn von nicht-infizierten und* T.gondii*-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen am Tag 40 nach Infektion. Für den immunhistologischen Nachweis der VCAM-1-Expression wurden Kryostatschnitte schockgefrorener Gehirne nicht-infizierter und infizierter VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäuse hergestellt. Die VCAM-1 Expression wurde mittels der Immunperoxidase-Methode bestimmt. AEC diente als chromogenes Substrat. Für die Gegenfärbung wurde der Farbstoff Hämalaun verwendet. Für die immunhistologische Untersuchung wurde die VCAM-1 Expression der Epithelzellen des Plexus choroideus von nicht-infizierten WT-Tieren (a; 220-fach) und nicht-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen (b; 220-fach) ermittelt sowie die VCAM-1 Expression der Endothelzellen zerebraler Blutgefäße von nicht-infizierten WT-Tieren (c; 400-fach) und nicht-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen (d; 110-fach) bestimmt. VCAM-1 wird nur schwach von einzelnen Blutgefäße (c, Pfeil) in nicht-infizierten WT-Tieren exprimiert. Im *T.gondii*-infizierten Gehirn wurde am Tag 40 nach Infektion die VCAM-1 Expression auf den Endothelzellen zerebraler Blutgefäße in WT-Mäusen (e; 250-fach) und VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen (f; 300-fach) immunhistologisch untersucht.

3.1.2 Bestimmung des Gewichts, der Überlebensrate und der Anzahl intrazerebraler Toxoplasmen in VCAM$^{flox/floxMxCre}$ Mäusen

Um zu überprüfen, ob die Resistenz in *T.gondii*-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ mutanten Mäusen im Vergleich zu VCAM$^{flox/flox}$ Kontrolltieren eingeschränkt ist, wurden die Tiere mit dem schwach virulenten *Toxoplasma*-Stamm DX oral infiziert und das Gewicht und die Überlebensrate bestimmt.

VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse verloren bis zum Tag 40 nach Infektion erheblich an Gewicht und verstarben schließlich bis zum Tag 50 nach Infektion. WT- Kontrolltiere dagegen nahmen bis zum Tag 40 an Gewicht zu, erholten sich von der Erkrankung und überlebten die Infektion (Abb. 3.2 A, B). Histologische Untersuchungen ergaben, dass VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse aufgrund einer unzureichenden Erregerkontrolle an einer chronischen TE verstarben. So war die Zahl der Toxoplasmen am Tag 12 und 40 nach Infektion im Hirn von VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht ($p < 0.001$ und $p < 0.00005$ für Tag 12 und 40 nach Infektion, Tab. 3.1). Außerdem waren die Nekrosen im Hirn von VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen vergrößert und wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe Tachyzoiten auf. Am Tag 12 nach Infektion unterschieden sich VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse und WT-Mäuse in der Anzahl der Parasiten in der Lunge und in der Leber nicht signifikant voneinander, während der Parasitengehalt im Herz und in der Milz von VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen erhöht war

($p < 0.05$, Tab. 3.1). Am Tag 40 nach Infektion waren in beiden experimentellen Gruppen weder Parasiten in der Lunge, Leber und Milz noch im Herzen nachweisbar.

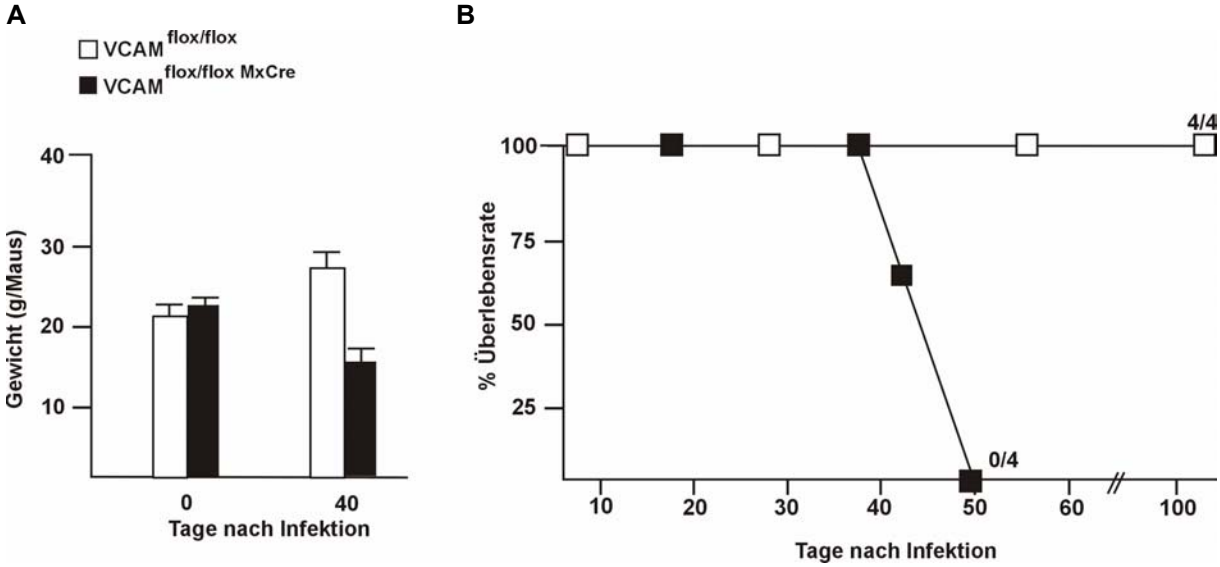


Abb. 3.2 Bestimmung des Gewichts und der Überlebensrate von* T.gondii-*infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen. Das Gewicht von VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen wurde vor und nach oraler Infektion (Tag 40) mit Zysten des schwach virulenten *Toxoplasma*-Stamms DX aus vier Mäusen pro Gruppe bestimmt und die Standardabweichung ermittelt (A). Die Überlebensrate von *T.gondii*-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen wurde für vier Mäuse pro Gruppe bestimmt (B). Die Ergebnisse wurden durch ein 2. Experiment bestätigt.

	VCAM$^{flox/floxMxCre}$	WT	
Hirn, Tag 12 p.i.	2.20 ± 0.61	0.56 ± 0.14	$p < 0.001$
Hirn, Tag 40 p.i.	1.06 ± 0.19	0.18 ± 0.051	$p < 0.00005$
Herz, Tag 12 p.i.	1.21 ± 0.41	0.00 ± 0.00	$p < 0.0001$
Herz, Tag 40 p.i.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	$p > 0.05$
Lunge, Tag 12 p.i.	85.58 ± 9.83	83.33 ± 5.56	$p > 0.05$
Lunge, Tag 40 p.i.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	$p > 0.05$
Leber, Tag 12 p.i.	1.88 ± 0.33	1.85 ± 0.45	$p > 0.05$
Leber, Tag 40 p.i.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	$p > 0.05$
Milz, Tag 12 p.i.	18.45 ± 5.67	6.74 ± 1.38	$p < 0.0005$
Milz, Tag 40 p.i.	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	$p > 0.05$

Tab 3.1 Bestimmung des Toxoplasmagehalts in* T.gondii-*infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen am Tag 12 und 40 nach Infektion (p.i.). Toxoplasmen wurden in Organschnitten immunhistologisch durch die Verwendung von polyklonalem anti-*T.gondii* Antiserum detektiert. Die Anzahl der Toxoplasmen wurde für 100 hochaufgelöste, mikroskopische Ausschnitte bestimmt und der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Unterschiede in der Anzahl der Parasiten zwischen VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen wurden mit dem Student t-Test berrechnet.

3.1.3 Einfluss der VCAM-1 Expression auf die Rekrutierung und Aktivierung der Leukozyten nach einer **T. gondii-***Infektion*

Während der akuten Phase einer *T.gondii*-Infektion infiltrieren periphere Leukozyten in das Gehirn (Schlüter *et al.,* 1997). VCAM-1 wird vom Gefäßendothel exprimiert und kann die Rekrutierung aktivierter Lymphozyten in die Infektionsherde peripherer Gewebe durch die Bindung seiner Liganden CD49d/CD29 (α4β1 Integrin) und CD49d/Integrin β7 (α4β7 Integrin) vermitteln (Kamata *et al*., 1995, Elices *et al*., 1990, Ruegg *et al*., 1992). Um zu klären, ob die eingeschränkte Resistenz von $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf eine verminderte Rekrutierung der Leukozyten in das Gehirn zurückzuführen ist, wurden am Tag 33 nach *T. gondii*-Infektion intrazerebrale Leukozyten beider Gruppen quantifiziert und phänotypisiert. Die Rekrutierung der Leukozyten ist in $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen nicht beeinträchtigt, da die Menge intrazerebraler $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten von $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren nicht reduziert war (Abb. 3.3).

Die durchflusszytometrische Untersuchung zur Expression der VCAM-1-Liganden CD49d/CD29 und CD49d/ Integrin β7 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ergab, dass in beiden Gruppen alle $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen für CD49d/CD29 positiv waren. Für CD49d/Integrin β7 waren rund 10% der $CD4^+$ T-Zellen und 22% der $CD8^+$ T-Zellen positiv (Abb. 3.4 A). Nach einer Infektion kommt es infolge der Aktivierung zu einer phänotypischen Veränderung der Leukozyten. Daher wurde neben der Rekrutierung der Einfluss von VCAM-1 auf die Aktivierung der zerebralen T-Zellen sowie Makrophagen und Mikroglia bestimmt. Die Aktivierung der T-Zellen wurde anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD44, CD62L (MEL14) und LFA-1 nachgewiesen. Obwohl die T-Zellen beider Gruppen CD44 und LFA-1 exprimierten, war die Expression auf intrazerebralen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zum WT reduziert. Damit waren $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen von $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe in ihrer Aktivierung eingeschränkt. CD62L wurde auf den T-Zellen beider Gruppen, wie für aktivierte T-Zellen typisch, schwach exprimiert (Abb. 3.4 B).

Auch die Aktivierung der Mikroglia und zerebraler Makrophagen war in $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe beeinträchtigt. Durchflusszytometrsiche Untersuchungen ergaben, dass die MHC-Kl. I und II Expression der zerebralen Makrophagen und Mikroglia, die im infizierten Tier erst nach Aktivierung *de novo* induziert wird, in $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren reduziert war (Abb. 3.5).

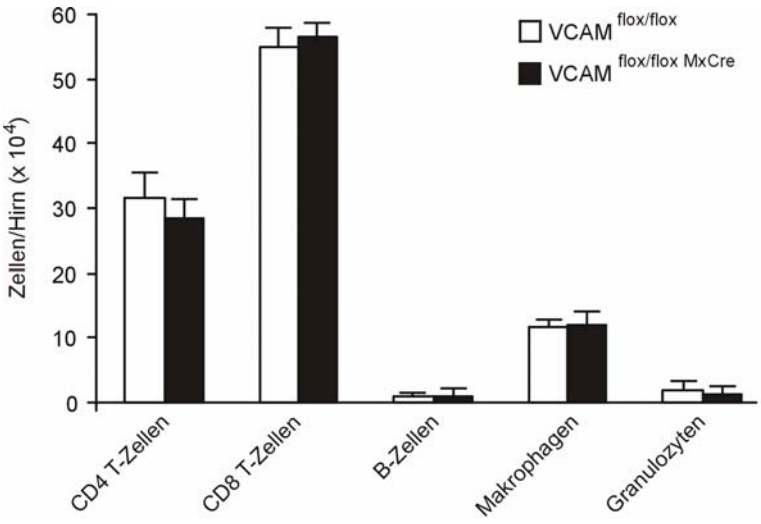


Abb. 3.3 Pänotypische Zusammensetzung intrazerebraler, imflammatorischer Leukozyten. Die Gehirne von je drei *T.gondii*-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen (VCAM$^{flox/flox}$) wurden am Tag 33 nach Infektion pro Gruppe gepoolt und die zerebralen Leukozyten isoliert. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden die Zellen jeweils mit anti-CD4, anti-CD8, anti-B220, anti-F4/80 und anti-GR.1 angefärbt und die absolute Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse geben den Mittelwert und die Standard-abweichung von drei unabhängigen Experimenten an.

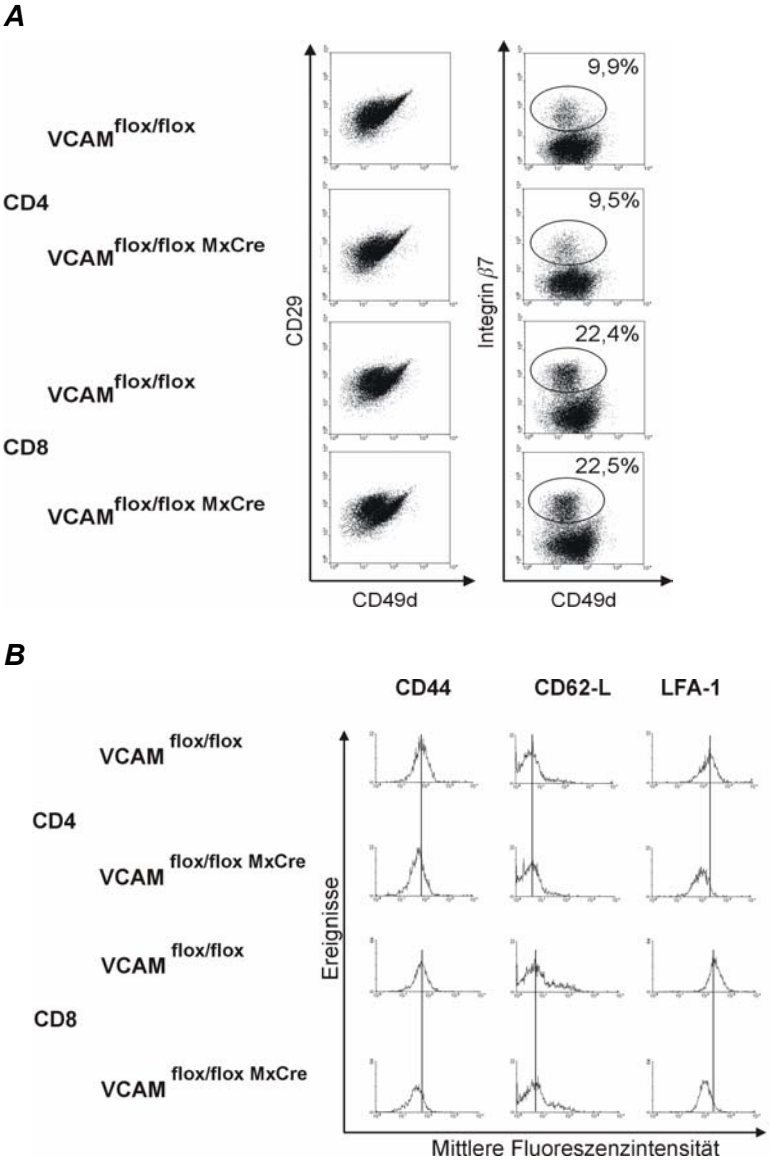


Abb. 3.4 Aktivierungsstatus von intrazerebralen CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen. Zerebrale Leukozyten von infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen (VCAM$^{flox/flox}$) wurden aus sechs Hirnen pro Gruppe, die zuvor gepoolt wurden, isoliert. Die Ko-Expression von CD49d und CD29 oder CD49d und Integrin β7 von CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse zeigen den prozentualen Anteil antigen-positiver Zellen relativ zur gesamten CD4$^+$ oder CD8$^+$ T-Zellpopulation (A). Die Expression von CD44, CD62-L und LFA-1 auf CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen wurde ebenfalls durchflusszytometrisch ermittelt. Die Ergebnisse sind als Histogramm dargestellt, das die mittlere Fluoreszenzintensität der CD44-, CD62-L- und LFA-1-Expression relativ zur gesamten CD4$^+$ oder CD8$^+$ T-Zellpopulation wiedergibt. Um den Vergleich zwischen VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäuse zu erleichtern, ist die mittlere Expression der genannten Antigene für die WT-Mäuse durch eine vertikale Linie angezeigt (B). Die Ergebnisse wurden durch ein zweite Untersuchung bestätigt.

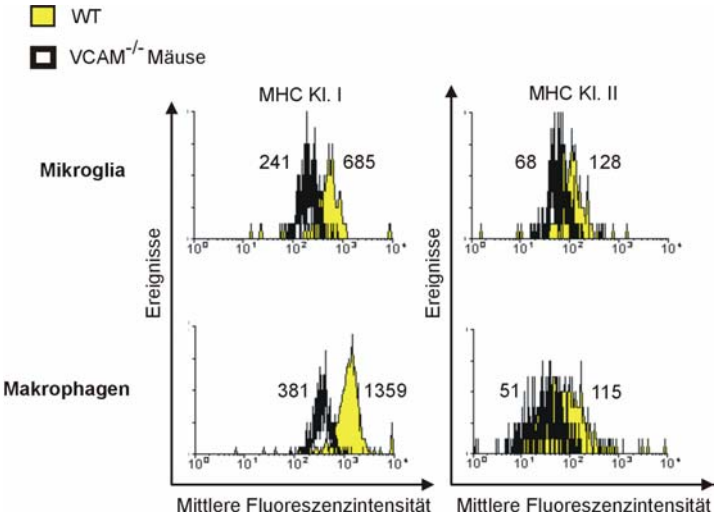


Abb. 3.5 MHC Kl. I und II Expression der Mikroglia und intrazerebraler Makrophagen. Für die Isolation von zerebralen Leukozyten wurden am Tag 33 nach Infektion drei Hirne infizierter VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ sowie drei Hirne infizierter WT-Mäuse jeweils gepoolt und die Expression von MHC Kl. I und II auf Makrophagen und Mikroglia durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind als Histogramm gezeigt, das die mittlere Fluoreszenzintensität der MHC Kl. I und II Expression relativ zur gesamten Makrophagen- oder Mikrogliapopulation darstellt. Vergleichbare Ergebnisse wurden durch einen zweiten Versuch erhalten

3.1.4 Bestimmung T. gondii*-spezifischer Antikörper in infizierten und nicht-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen*

VCAM-1 wird nicht nur eine Funktion bei der Rekrutierung aktivierter Lymphozyten zugeschrieben, sondern es trägt möglicherweise auch zur T-Zell-abhängigen, humoralen Immunantwort bei (Leuker *et al*., 2001). Um den Gehalt spezifischer Antikörper in *T.gondii*-infizierten und nicht-infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrolltieren zu analysieren, wurden Seren am Tag 0, 16 und 33 nach Infektion gewonnen. *T.gondii*-spezifische IgG und IgM Antikörper wurden mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bildung *T.gondii*-spezifischer Antikörper in infizierten VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich vermindert ist. So war der Gehalt an spezifischen IgG-Antikörpern um das 10-fache reduziert. *T. gondii*-spezifische IgM-Antikörper wiesen am Tag 16 eine 10-fache und am Tag 33 sogar eine 100-fache Reduktion im Vergleich zu WT-Tieren auf. Im Serum nicht-infizierter Tiere beider Gruppen waren mittels ELISA keine Antikörper nachweisbar (Abb. 3.6).

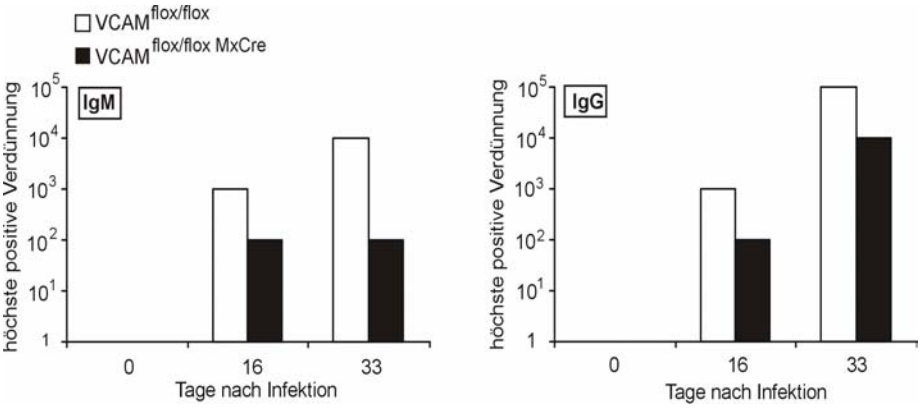


Abb. 3.6 Produktion* T.gondii*-spezifischer IgG und IgM Antikörper in VCAM$^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen. Das Serum wurde aus drei nicht-infizierten und *T.gondii*-infizierten Mäusen gewonnen, seriell verdünnt (10^1 - 10^6) und *T.gondii*-spezifische IgG und IgM Antikörper mittels ELISA bestimmt.

Die Ergebnisse geben die höchste positive Verdünnung an. Zwei weitere Versuche ergaben vergleichbare Ergebnisse.

3.1.5 Frequenz T.gondii-*spezifischer T-Zellen*

Sowohl $CD8^+$ als auch $CD4^+$ T-Zellen produzieren das Zytokin IFN-γ, das entscheidend für die Vermittlung einer protektiven Immunantwort gegen *T. gondii* ist (Denkers & Gazzinelli 1998). Es wurde untersucht, ob die Expression von VCAM-1 die Frequenz *T.gondii*-spezifischer IFN-γ produzierender T-Zellen beeinflusst. Dazu wurden die Leukozyten des Hirns und der Milz aus $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen am Tag 33 nach Infektion isoliert und die IFN-γ Produktion Antigen-spezifischer Milz- und Hirnleukozyten mit einem IFN-γ-ELISPOT detektiert. *T.gondii*-spezifische IFN-γ-produzierende T-Zellen waren in Milz und Hirn in $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse stark vermindert. In nicht-infizierten Mäusen ließen sich keine IFN-γ produzierenden T-Zellen in beiden Gruppen nachweisen (Abb. 3.7).

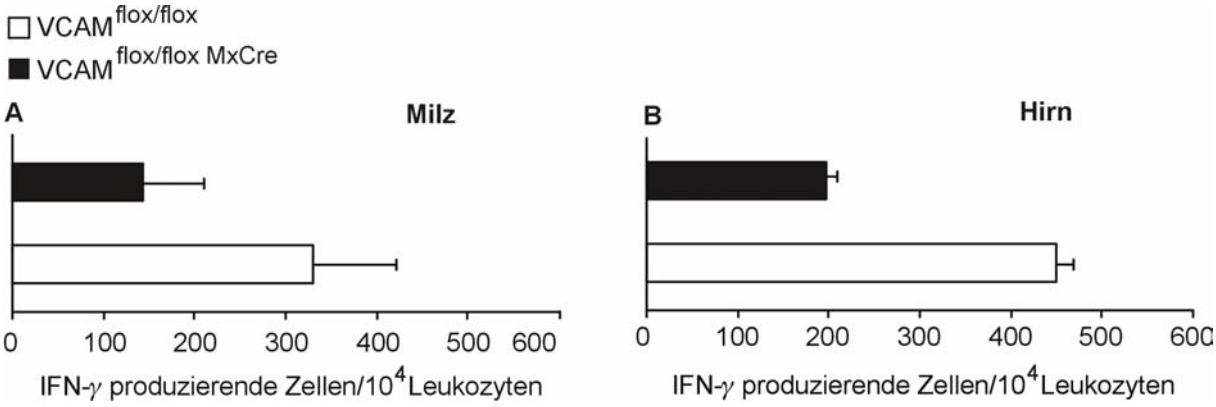


Abb. 3.7 Frequenz* T.gondii-*spezifischer T-Zellen. Die Leukozyten wurden aus sechs gepoolten Milzen und Hirnen von *T.gondii*-infizierten $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ und WT-Mäusen ($VCAM^{flox/flox}$) am Tag 33 nach Infektion isoliert. Die Frequenz *T.gondii*-spezifischer T-Zellen wurde mit Hilfe des IFN-γ ELISPOT-Verfahrens ermittelt. Als Antigen wurde HKT (2 Parasiten/5 Leukozyten) eingesetzt. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert von Triplikaten IFN-γ produzierender T-Zellen der Milz (A) und des Hirns (B).

3.2 Funktionelle Charakterisierung CD4$^+$ T-Zellen bei der Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort

Die Funktion CD4$^+$ T-Zellen bei der Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort wurde in CB6-Mäusen (H-2$^{b/d}$), die den *T.gondii*-resistenten Mäusen angehören (Suzuki *et al*., 1994), analysiert. Dazu wurden CD4$^+$ T-Zellen in diesen Mäusen durch eine Depletion eliminiert. Außerdem wurden MHC Kl. II-defiziente Mäuse (H-2L^b), denen aufgrund der MHC Kl. II-Defizienz konventionelle CD4$^+$ T-Zellen fehlen (Köntgen *et al*., 1993), und CD4-depletierte, MHC Kl. II-defiziente Mäuse sowie CD4-depletierte C57BL/6 Mäuse (H-2L^b), die zu den *T.gondii*-suszeptiblen Mausstämmen zählen (Suzuki *et al*., 1994), in die Untersuchungen einbezogen.

3.2.1 Untersuchung von *T.gondii*-infizierten CD4-depletierten CB6-Mäuse

Für die folgenden Versuche wurden CD4$^+$ T-Zellen in CB6-Mäuse vor der Infektion an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit anti-CD4 monoklonalen Antikörpern depletiert und die Depletion bis zum Versuchsende weitergeführt. Solche Mäuse besitzen keine CD4$^+$ T-Zellen. Der Erfolg der Depletion wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 3.8). Mit diesem Versuchsansatz konnte die Bedeutung von CD4$^+$ T-Zellen für die Induktion einer Immunantwort in der akuten Phase der Toxoplasmose analysiert werden. Als Kontrollgruppe dienten nicht-depletierte CB6-Mäuse (WT). Für die Infektion wurden Zysten des β-Galaktosidase-exprimierenden *Toxoplasma*-Stamms PruS1SPLACZ (Kwok *et al*., 2003) oral appliziert.

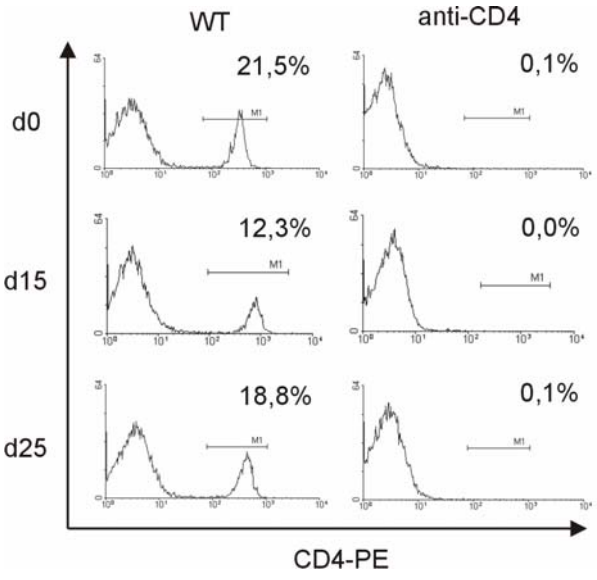


Abb. 3.8 Durchflusszytometrischer Nachweis der CD4-Depletion in CB6-Mäusen. Zur Depletion wurden CB6-Mäusen an drei aufeinanderfolgenden Tagen vor Infektion monoklonale anti-CD4 Antikörper (Klon GK1.5; 0,5mg/Maus) i.p. injiziert und die Behandlung nach Infektion alle drei bis vier Tage bis zum Versuchsende fortgesetzt. Leukozyten der Milz CD4-depletierter (anti-CD4) und nicht-depletierter (WT) Mäuse wurden am Tag 0, 15 und 25 nach Infektion isoliert und für den durchflusszytometrischen Nachweis der CD4-Depletion mit CD4-PE angefärbt. Die Werte gebend den prozentualen Anteil der CD4$^+$ T-Zellen relativ zur gesamten Leukozytenpopulation an.

3.2.1.1 Einfluss einer CD4-Depletion auf das Gewicht und Überleben von **T.gondii-***infizierten CB6-Mäusen*

Um zu überprüfen, ob das Fehlen $CD4^+$ T-Zellen die Resistenz in *T.gondii*-infizierten CB6-Mäusen beeinträchtigt, wurde das Gewicht und die Überlebensrate von *T.gondii*-infizierten $CD4^+$ depletierten CB6-Mäusen und nicht-depletierten Kontrolltieren bestimmt. Infizierte CD4-depletierte, CB6-Mäuse verloren am Tag 20 nach Infektion fast die Hälfte ihres Ursprungsgewichts. Nicht-depletierte Kontrolltiere nahmen dagegen im gleichen Zeitraum leicht an Gewicht zu (Abb. 3.9A). Neben dem erheblichen Gewichtsverlust zeigten CD4-depletierte Mäuse eine hohe Mortalitätsrate. Während nicht-depletierte Kontrolltiere die *T.gondii*-Infektion bis über den Tag 50 hinaus überlebten, verstarben 80 % der CD4-depletierten CB6-Mäuse bis zum Tag 28 nach Infektion (Abb. 3.9 B).

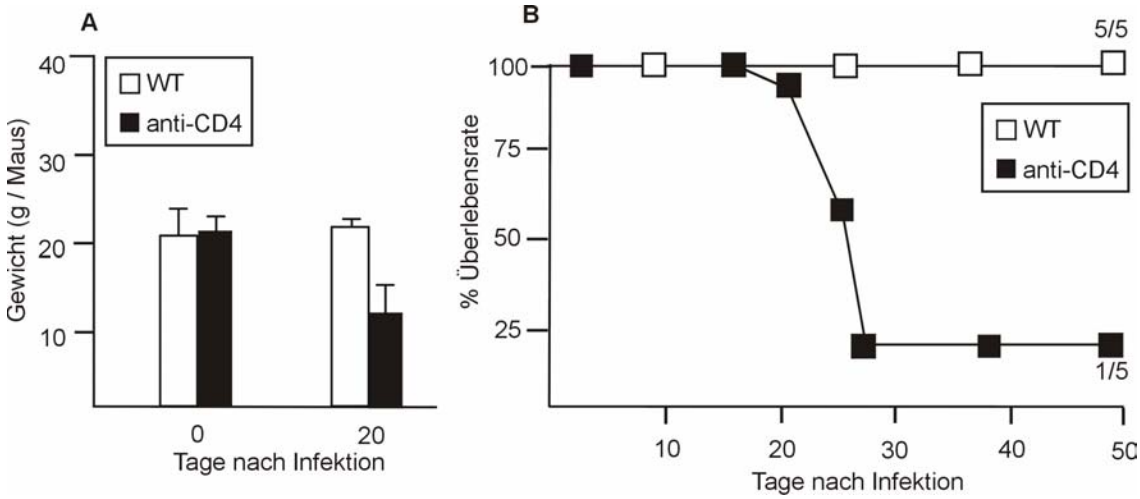


Abb. 3.9 Bestimmung des Gewichts und der Überlebensrate von* T.gondii-*infizierten, CD4-depletierter CB6-Mäusen und WT-Tieren. CB6-Mäuse wurden vor Infektion mit monoklonalen anti-CD4 Antikörpern behandelt und die Depletion bis zum Versuchsende weitergeführt. Für die Infektion wurde CD4-depletierten Mäusen, sowie nicht-depletierten Kontrolltieren Zysten des β-Galaktosidase exprimierenden *Toxoplasma*-Stamms PruS1SPLACZ oral appliziert. Das Gewicht wurde am Tag 0 und 20 nach Infektion bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt (A). Die Überlebensrate wurde von 5 *T.gondii*-infizierten Tieren pro Gruppe ermittelt (B). Vergleichbare Ergebnisse wurden in einem zweiten Experiment beobachtet.

3.2.1.2 Histologischer Nachweis der Toxoplasmen im Gehirn

Intrazerebrale Toxoplasmen wurden immunhistologisch durch die indirekte Immunperoxidase-Methode nach oraler Infektion mit *T.gondii* in CD4-depletierten CB6-Mäusen und Kontrolltieren am Tag 25 nach Infektion nachgewiesen. Zur Detektion wurde polyklonales anti-*T.gondii* Antiserum verwendet. Die histologischen Untersuchungen

machten deutlich, dass *T.gondii*-infizierte, CD4-depletierte CB6-Mäuse (a) im Vergleich zur nicht-depletierten Kontrollgruppe (b) am Tag 25 nach Infektion einen erhöhten Parasitengehalt und vergrößerte Nekrosen aufwiesen (Abb. 3.10 a, b). Da CD4-depletierte CB6-Mäuse den Erreger nur unzureichend kontrollierten, verstarben sie schließlich an einer nekrotisierenden TE. *T.gondii*-infizierte, nicht-depletierte CB6-Mäuse entwickelten eine chronisch persistierende, nicht-letale TE, wie dies für CB6-Mäuse von Kwok *et al*., 2003 und Suzuki *et al*., 1994 beschrieben wurde. Die Anzahl von intrazerebralen *Toxoplasma*-Zysten wurde für 50 hochaufgelöste, mikroskopische Ausschnitte am Tag 25 nach Infektion bestimmt. CD4-depletierte CB6-Mäuse wiesen 15 (± 3) Zysten/mikroskopischen Ausschnitt auf, während für WT-Tiere 0,8 (±0,04) Zysten/mikroskopischen Ausschnitt ermittelt wurden. Damit bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) in der Anzahl der zerebralen Toxoplasmen zwischen den Gruppen.

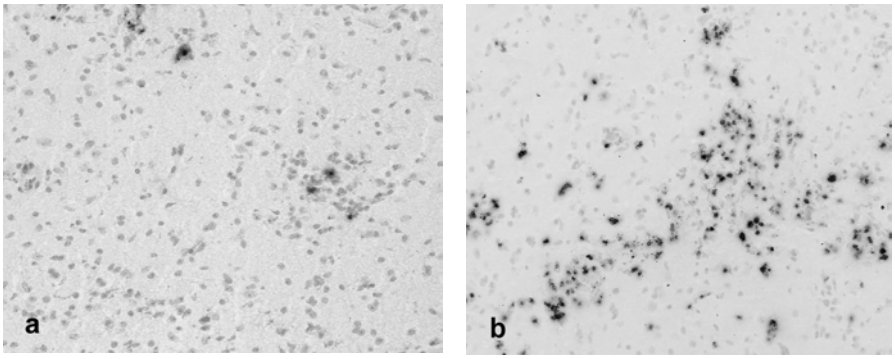


Abb. 3.10 Histologischer Nachweis der Toxoplasmen in* T.gondii-*infizierten, CD4-depletierten CB6-Mäusen und WT-Tieren. Für den immunhistologischen Nachweis intrazerebraler Toxoplasmen in Kryostatschnitten schockgefrorener Gehirne wurde die indirekten Immunperoxidase-Methode eingesetzt. Zur Detektion wurde polyklonales anti-*T.gondii* Antiserum verwendet. Als chromogenes Substrat wurde AEC und für die Gegenfärbung Hämalaun eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen die immunhistologische Färbung intrazerebrale Toxoplasmen in *T.gondii*-infizierten WT-Tieren (a) und CD4-depletierten Mäusen (b) am Tag 25 nach Infektion.

3.2.1.3 Phänotypische Charakterisierung der Milz- und Hirnleukozyten von infizierten, CD4-depletierten CB6-Mäusen und nicht-depletierten Kontrolltieren

Die absolute Leukozytenzahl der Milz und des Hirns *T.gondii*-infizierter, CD4-depletierter CB6-Mäuse und Kontrollmäuse wurde am Tag 0, 15 und 25 nach Infektion ermittelt. Die phänotypische Zusammensetzung wurde am Tag 15 nach Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. *T.gondii* induziert eine starke Infiltration peripherer Leukozyten in das Gehirn (Schlüter *et al.,* 1997). So stieg die Zahl intrazerebraler Leukozyten in CD4-depletierten Mäusen fast um das 4fache und in WT-Tieren um das 3,4fache bis zum Tag 25 nach Infektion an (Abb. 3.11 A). In der Milz erreichte die Anzahl der Leukozyten am Tag 15 nach Infektion in beiden Gruppen ihren Maximalwert und nahm fast um das 2fache (anti-CD4) und um das

1,4fache (WT) zu (Abb. 3.11 B). Die phänotypische Analyse der Hirnleukozyten ergab, dass sich infiltrierte Leukozyten insbesondere aus $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zusammensetzten, wie dies bereits von Schlüter *et al.,* 1997 beschrieben wurde. Während in infizierten WT-Tieren sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen gleichermaßen vorhanden waren, zeichneten sich infizierte CD4-depletierte CB6-Mäuse durch das Fehlen $CD4^+$ T-Zellen und durch einen verstärkten Anstieg intrazerebraler $CD8^+$ T-Zellen im Vergleich zum WT aus. Neben T-Zellen wurden in einem geringeren Ausmaß auch intrazerebrale B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen in beiden Gruppen detektiert (Abb. 3.11 C). In der Milz wurden am Tag 15 nach Infektion sowohl T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen für beide Gruppen durchflusszytometrisch nachgewiesen. Dabei war in CD4-depletierten CB6-Mäuse, neben der fehlenden $CD4^+$ T-Zellpopulation, die Granulozytenzellzahl im Vergleich zum WT vermindert (Abb. 3.11 D).

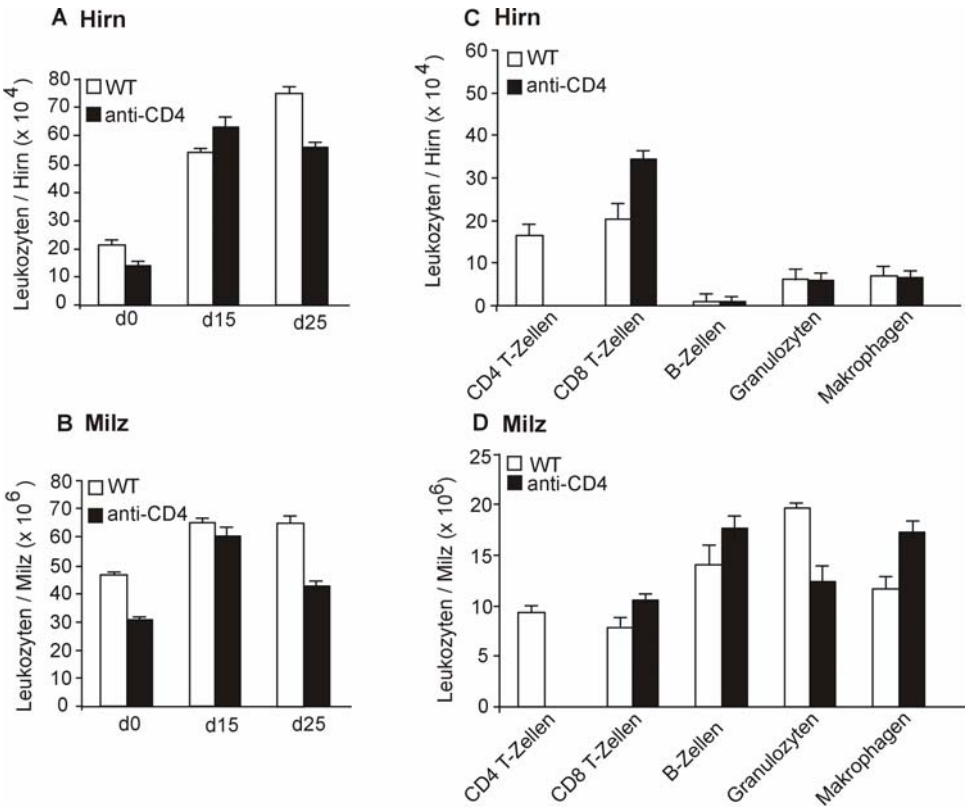


Abb. 3.11 Phänotypische Analyse lienaler und intrazerebraler Leukozyten. Die Leukozyten wurden aus *T.gondii*-infizierten, CD4-depletierten Mäusen und WT-Tieren am Tag 0, 15 und 25 nach Infektion aus acht Tieren pro Gruppe isoliert und gepoolt. Die absolute Gesamtzellzahl der Leukozyten aus Hirn (A) und Milz (B) wurde durch die mikroskopische Auszählung ermittelt. Die phänotypische Zusammensetzung wurde durchflusszytometrisch durch die Anfärbung der Hirn- und Milzleukozyten jeweils mit anti-CD4, anti-CD8, anti-B220 und anti-GR.1 am Tag 15 nach Infektion bestimmt (C,D). Im Hirn wurden Makrophagen durch die Anfärbung der Leukozyten mit F4/80 und CD45 (LCA) durch die erhöhte CD45-Expression von der Mikroglia unterschieden. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und Standartabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.1.4 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von CD8$^+$ T-Zellen in nicht-infizierten und T.gondii-*infizierten, CD4-depletierten CB6-Mäusen und WT-Tieren*

Das Modellantigen β-Galaktosidase aus *Escherichia coli* enthält das definierte CD8 T-Zellepitop β-gal$_{876-884}$ (Rammensee *et al*., 1989). Durch die Verwendung des β-Galaktosidase-transfizierten *Toxoplasma*-Stamms PruS1SPLACZ (Kwok *et al*., 2003) war es daher möglich, CD8$^+$ T-Zellen in PruS1SPLACZ *T. gondii*-infizierten CB6-Mäusen (H-2^{bxd}) Antigen-spezifisch, auf Peptid-Ebene zu untersuchen.
Es wurde überprüft, ob die Induktion einer *T.gondii*-spezifischen CD8$^+$ T-Zellantwort in infizierten CD4-depletierten CB6-Mäusen reduziert ist. Dazu wurde die Frequenz, der Aktivierungsstatus, die IFN-γ und TNF-α-Produktion sowie zytotoxische Aktivität von β-gal$_{876-884}$–spezifischen CD8$^+$ T-Zellen bestimmt.

3.2.1.4.1 Frequenz und Aktivierungsstatus von β-gal$_{876-884}$-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen

Die Frequenz β-gal$_{876-884}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen wurde in der Milz am Tag 0, 15 und 25 und im Hirn am Tag 15 und 25 in CD4-depletierten CB6-Mäusen und WT-Tieren untersucht. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde die Tetramerfärbung (H-2L^d/β-gal$_{876-884}$Tetramer-PE) eingesetzt (siehe dazu auch Abb. 2.1, Seite 31). Außerdem wurde die absolute Zellzahl β-gal$_{876-884}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen ermittelt. Der Aktivierungsstatus Tetramer-positiver CD8$^+$ T-Zellen wurde über die Expression von CD44 und CD62L, die von aktivierten T-Zellen verstärkt gebildet werden, am Tag 15 und 25 nach Infektion bestimmt.
In beiden Gruppen induzierte die Infektion mit PruS1SPLACZ *T.gondii* in der Milz und im Hirn eine starke β-gal$_{876-884}$-spezifische CD8$^+$ T-Zellantwort. Obwohl die Frequenz β-gal$_{876-884}$–spezifischer CD8$^+$ T-Zellen der Milz am Tag 15 und 25 in CD4-depletierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren leicht erhöht war (Abb. 3.12 A), machte die Auswertung der absoluten Zellzahlen β-gal$_{876-884}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen deutlich, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand (Abb. 3.12 B). Im Hirn war der prozentuale Anteil β-gal$_{876-884}$–spezifischer CD8$^+$ T-Zellen am Tag 25 in CD4-depletierten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht reduziert (Abb. 3.12 C). Wie auch für die Milz waren die absoluten Zellzahlen β-gal$_{876-884}$–spezifischer CD8$^+$ T-Zellen beider Gruppen vergleichbar (Abb. 3.12 D).

Die phänotypische Analyse machte deutlich, dass β-gal$_{876-884}$–spezifische CD8$^+$ T-Zelle aus CD4-depletierten und nicht-depletierten Mäusen einen für aktivierte T-Zellen charakteristischen Phänotyp aufwiesen. So waren in Milz und Hirn am Tag 15 und Tag 25 nach Infektion in beiden Gruppen β-gal$_{876-884}$–spezifische CD8$^+$ T-Zelle für CD44 positiv (Abb. 3.13 A), während ein Großteil dieser Zellen CD62L nicht exprimierte (Abb. 3.13 B). Peptid-spezifische CD8$^+$ T-Zelle von CD4-depletierten Mäusen zeigten keinen wesentlichen Unterschied in ihrem Aktivierungsstatus im Vergleich zu WT-Tieren.

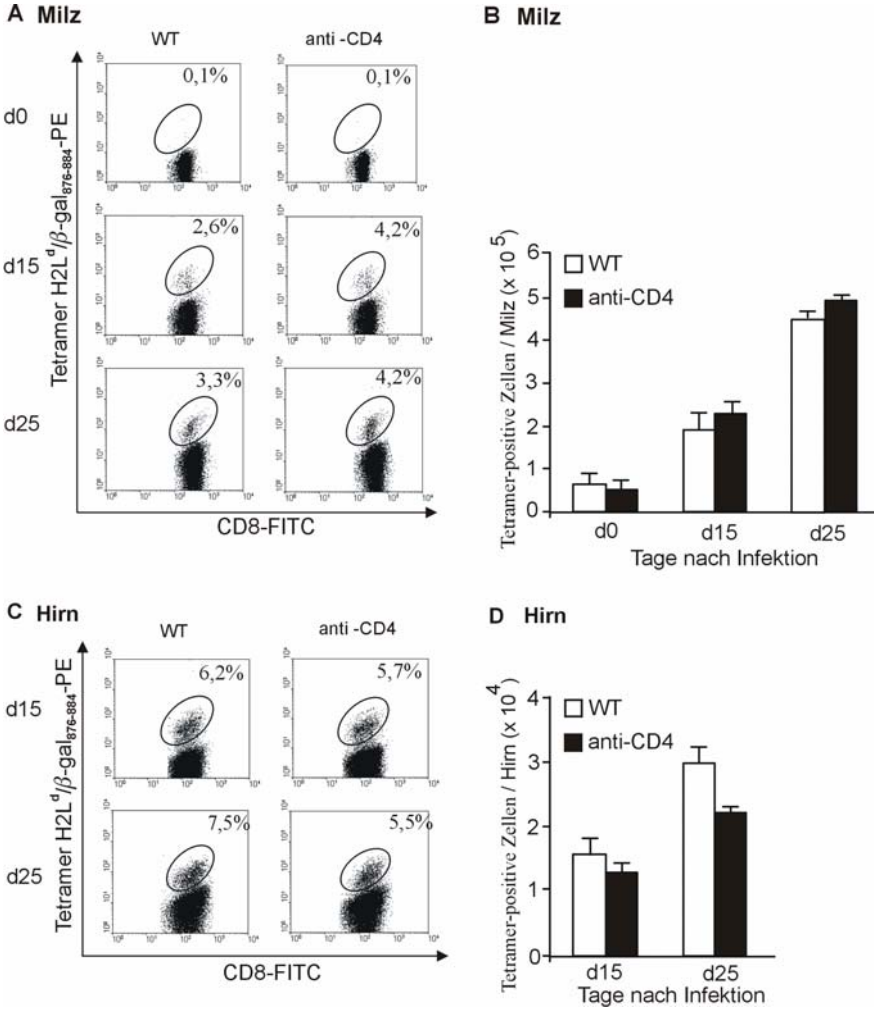
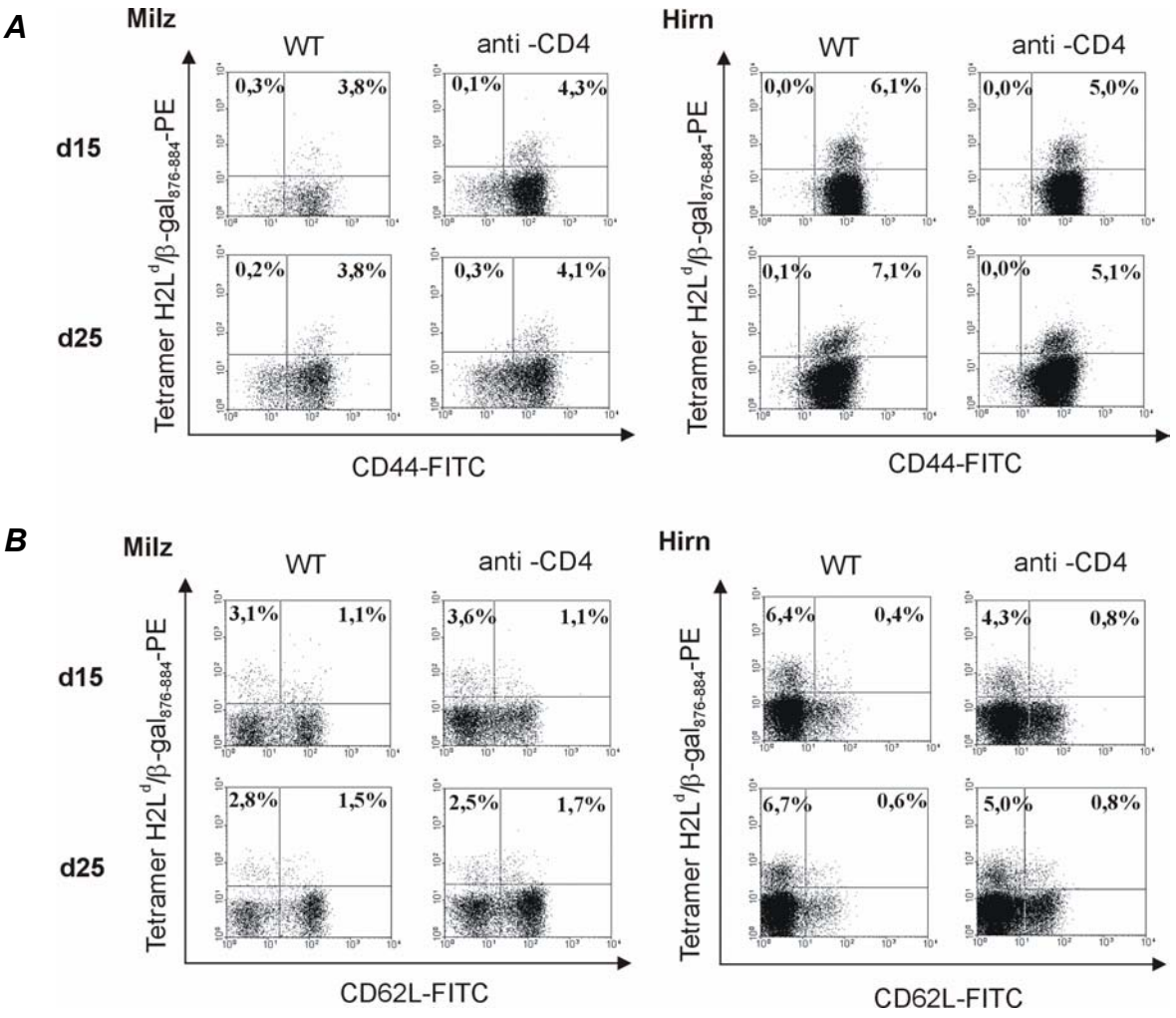


Abb. 3.12 Frequenz β-gal$_{876-884}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen der Milz und des Hirns. CD4-depletierte CB6-Mäuse und nicht-depletierte WT-Tiere wurden mit *T.gondii*-PruS1SPLACZ oral infiziert. Milz- und Hirnleukozyten wurden am Tag 0, 15 und 25 nach Infektion aus acht Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt isoliert und gepoolt. β-gal$_{876-884}$-spezifische CD8$^+$ T-Zellen wurden durch die Anfärbung mit anti-CD8-FITC und dem Tetramer-Reagenz (H-2K^b/β-gal$_{876-884}$-PE) durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse geben den prozentualen Anteil H-2K^b/β-gal $_{876-884}$-positiver Zellen relativ zur gesamten CD8$^+$ T-Zellpopulation der Milz (A) und des Hirns (C) wieder. Zusätzlich wurde die absolute Zellzahl β-gal$_{876-884}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen für Milz (B) und Hirn (D) bestimmt. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zwei weiteren Experimenten ermittelt.



3.13 Aktivierungsstatus von β-gal$_{876-884}$-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen aus CD4-depletierten CB6-Mäusen und nicht-depletierten WT-Tieren. Um den Aktivierungsstatus von β-gal$_{876-884}$-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch zu ermitteln, wurden Milz- und Hirnleukozyten aus nicht-infizierten und *T.gondii*-infizierten Mäusen (Tag 15 und 25) aus acht Tieren pro Gruppe isoliert und gepoolt. Neben anti-CD8-Cychrome und Tetramer-H-2K^b/β-gal $_{876-884}$-PE wurden die Leukozyten zusätzlich mit anit-CD44-FITC (A) oder anti-CD62L-FITC (B) angefärbt. Die Ergebnisse, die durch ein zweites Experiment bestätigt wurden, geben den prozentualen Anteil Antigen-positiver Zellen relativ zur gesamten CD8$^+$ T-Zellpopulation wieder.

3.2.1.4.2 β-gal$_{876-884}$–spezifische IFN-γ und TNF-α-Produktion von CD8$^+$ T-Zellen

IFN-γ ist für die Kontrolle des intrazellulären Erregers *T.gondii* essentiell und wird in seiner Funktion von TNF-α synergistisch unterstützt (Denkers & Gazzinelli, 1998). Daher wurde über die IFN-γ und TNF-α Produktion ermittelt, ob das Fehlen CD4$^+$ T-Zellen sich reduzierend auf eine β-gal$_{876-884}$–spezifische CD8$^+$ T-Zellantwort auswirkt. IFN-γ und TNF-α wurden durch die intrazelluläre Anfärbung dieser Zytokine in CD8$^+$ T-Zellen der Milz und des Hirns von CD4-depletierten CB6 Mäusen und WT-Tieren am Tag 15 und 25 nach Infektion nachgewiesen. Die IFN-γ und TNF-α Produktion von β-gal$_{876-884}$–spezifischen CD8$^+$ T-Zellen wurde dabei durch die Restimulierung der Leukozyten mit Peptid (β-gal$_{876-884}$) ermittelt. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass nach einer *T.gondii*-Infektion in beiden Gruppen eine starke IFN-γ Produktion in β-gal$_{876-884}$–spezifischen CD8$^+$ T-Zellen induziert wurde. In der Milz war am Tag 25 nach Infektion die intrazelluläre IFN-γ Produktion Peptid-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen in CD4-depletierten CB6-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abb. 3.14 A). Im Hirn dagegen zeigten β-gal$_{876-884}$–spezifische CD8$^+$ T-Zellen in CD4-depletierten Tieren insbesondere am Tag 15 sowie auch am Tag 25 eine reduzierte IFN-γ Produktion im Vergleich zur nicht-depletierten Kontrollgruppe (Abb. 3.14 B).

Auch die Bildung von TNF-α wurde durch die Infektion mit *T.gondii* in CD8$^+$ T-Zellen CD4-depletierter Mäuse und nicht-depletierter Kontrolltiere induziert. Während in der Milz zwischen beiden Gruppen kein wesentlicher Unterschied bestand (Abb. 3.14 C), war die TNF-α Produktion von Peptid-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen im Hirn am Tag 25 nach Infektion in CD4-depletierten Tieren im Vergleich zum WT vermindert (Abb. 3.14 D).

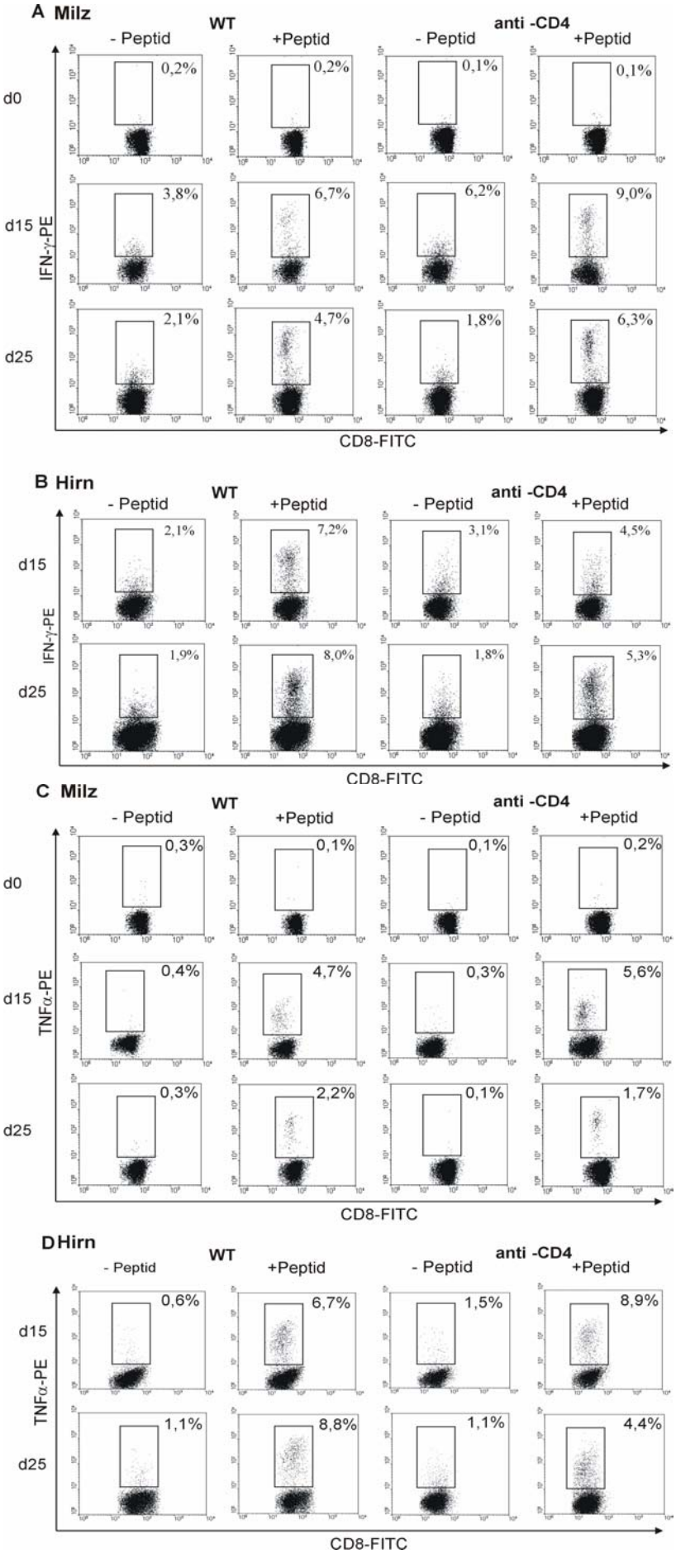


Abb. 3.14 IFN-γ und TNF-α Produktion β-gal$_{876-884}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen in Milz und Hirn. Für die Infektion von CD4-depletierten und WT-Mäusen, wurde den Tieren Zysten des β-Galaktosidase-exprimierenden *Toxoplasma*-Stamms PruS1SPLACZ oral appliziert und die Leukozyten der Milz und des Hirns aus acht Tieren pro Gruppe am Tag 0, 15 und 25 isoliert und gepoolt. Die Leukozyten wurden mit dem Peptid β-gal$_{876-884}$ (10^{-7} M) oder ohne Peptid, in der Präsens des Proteintransportinhibitors Brefeldin A (1 µl/ml), restimuliert. Die Zytokinproduktion CD8$^+$ T-Zellen wurde durch die intrazelluläre Anfärbung von IFN-γ und TNF-α durchflusszytometrisch nachgewiesen. Für die intrazelluläre Anfärbung wurden die Zellen vorher fixiert und permeabilisiert. Die Ergebnisse zeigen den prozentualen Anteil der IFN-γ Produktion CD8$^+$ T-Zellen aus Milz (A) und Hirn (B), sowie der TNF-α Produktion CD8$^+$ T-Zellen aus Milz (C) und Hirn (D) relativ zur gesamten CD8$^+$ T-Zellpopulation. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einem weiteren, unabhängigen Experiment gewonnen.

3.2.1.4.3 Zytotoxische Aktivität von β-gal$_{876-884}$-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen in T.gondii-*infizierten, CD4-depletierten und nicht-depletierten CB6-Mäusen*

Da CD8$^+$ T-Zellen auch über ihre Zytotoxizität zur Protektion gegen *T.gondii* beitragen (Denkers & Gazzinelli, 1998), wurde die zytotoxische Aktivität β-gal$_{876-884}$–spezifischer CD8$^+$ T-Zelle der Milz und des Hirns mittels eines Zytotoxizitätstest (Chrom-release-assay) untersucht. In der Milz war am Tag 15 und 25 die zytotoxische Aktivität der Leukozyten in beiden experimentellen Gruppen nur sehr schwach und lag unter 10% (Daten wurden daher nicht gezeigt). Im Hirn dagegen waren sowohl am Tag 15 als auch am Tag 25 in beiden Gruppen intrazerebrale Leukozyten in der Lage, die mit β-gal$_{876-884}$–Peptid beladenen Zielzellen effektiv zu lysieren. Die zytotoxische Aktivität von zerebralen, Peptid-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen aus CD4-depletierten Mäusen war aber im Vergleich zur nicht-depletierten Kontrollgruppe verringert (Abb. 3.15 A, B). Da die Anzahl zerebraler β-gal$_{876-884}$ spezifischer CD8$^+$ T-Zellen von CD4-depletierten und nicht-depletierten Mäusen vergleichbar war (Abb. 3.12D), konnte ausgeschlossen werden, dass graduelle Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität durch eine unterschiedliche Anzahl intrazerebraler, Tetramer-H-2L^d/β-gal$_{876-884}$ positiver Zellen verursacht wurden. Insgesamt war die zytotoxische Aktivität Peptid-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen in beiden Gruppen am Tag 15 höher als am Tag 25 nach Infektion (Abb. 3.15 A, B).

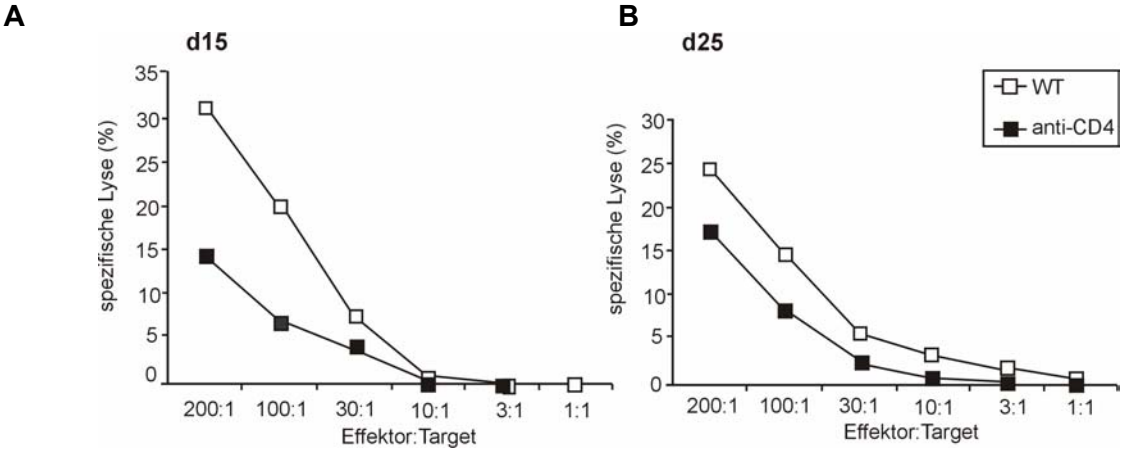


Abb. 3.15 Zytotoxizität intrazerebraler β-gal$_{876-884}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen. Die zytotoxische Aktivität von β-gal$_{876-884}$-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen wurde mit Hilfe des Zytotoxizitätstest (Chrom-release-assay) in *T.gondii*-infizierten, CD4-depletierten Mäusen und WT-Tieren bestimmt. Dazu wurden P815-Zielzellen (Target) mit β-gal$_{876-884}$-Peptid-beladen, mit ^{51}Cr-markiert und schließlich mit CD4$^+$ Effektorzellen in einem unterschiedlichem Effektor/Target Verhältnis inkubiert. Als Negativkontrolle dienten nicht-Peptid beladene P815-Zellen. Die ^{51}Cr-Freisetzung wurde im Gamma-counter gemessen. Die Zytotoxizität von β-gal$_{876-884}$-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen wurde ermittelt, indem die Werte der ^{51}Cr-Freisetzung Peptid-beladener P815-Zellen von den Werten der Negativkontrolle subtrahiert wurden. Die zytotoxische Aktivität Peptid-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen wurde am Tag 15 (A) und 25 (B) nach Infektion bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert von Triplikaten.

3.2.1.5 Bestimmung T.gondii-*spezifischer Antikörper im Serum und Liquor von infizierten, CD4-depletierten und nicht-depletierten CB6-Mäusen*

Bei der T-Zell-abhängigen B-Zellantwort benötigen B-Zellen für die Produktion spezifischer Antikörper die Hilfe von aktiven $CD4^+$ T-Zellen. Ob $CD4^+$ T-Zellen auch in *T.gondii*-infizierten CB6-Mäusen für die Generierung einer *T.gondii*-spezifischen Antikörperantwort nötig sind, wurde im Folgenden überprüft. Dazu wurde das Serum und der Liquor am Tag 0, 15 und 25 nach Infektion aus CD4-depletierten und nicht-depletierten CB6-Mäusen gewonnen und die Bildung *T.gondii*-spezifischer IgG, IgM und IgA Antikörper mittels ELISA untersucht. Da nur begrenzte Mengen an Liquor den Mäusen entnommen werden kann und IgA Antikörper im Liquor keine wesentliche Rolle spielen, wurde auf die Untersuchung der IgA Antikörper im Liquor verzichtet.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass CD4-depletierte CB6-Mäuse in der Bildung *T.gondii*-spezifischer Antikörper erheblich eingeschränkt sind. Im Serum waren insbesondere *T.gondii*-spezifische IgG Antikörper von CD4-depletierten Mäusen im Vergleich zur nicht-depletierten Kontrollgruppe stark verringert und wiesen am Tag 15 eine 100fache und am Tag 25 nach Infektion eine 100.000fache Reduktion auf. Spezifische IgM-Antikörper waren sowohl am Tag 15 als auch am 25 nach Infektion in CD4-depletierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 10fache verringert. In der Bildung *T.gondii*-spezifischer IgA Antikörper bestand kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 3.16 A). Im Liqour führte die CD4-Depletion zum kompletten Verlust *T.gondii*-spezifischer IgG und IgM Antikörper. Dagegen wurde im Liquor nicht-depletierter Kontrolltiere spezifische IgG Antikörper noch bei einer Liquorverdünnung von $1:10^3$ (Tag 25) und IgM-Antikörper bei einer Verdünnung von $1:10^2$ (Tag 15) detektiert (Abb. 3.16 B). In nicht-infizierten Tieren (Tag 0) waren im Serum und Liquor beider Gruppen keine spezifischen Antikörper nachweisbar (Abb. 316 A, B).

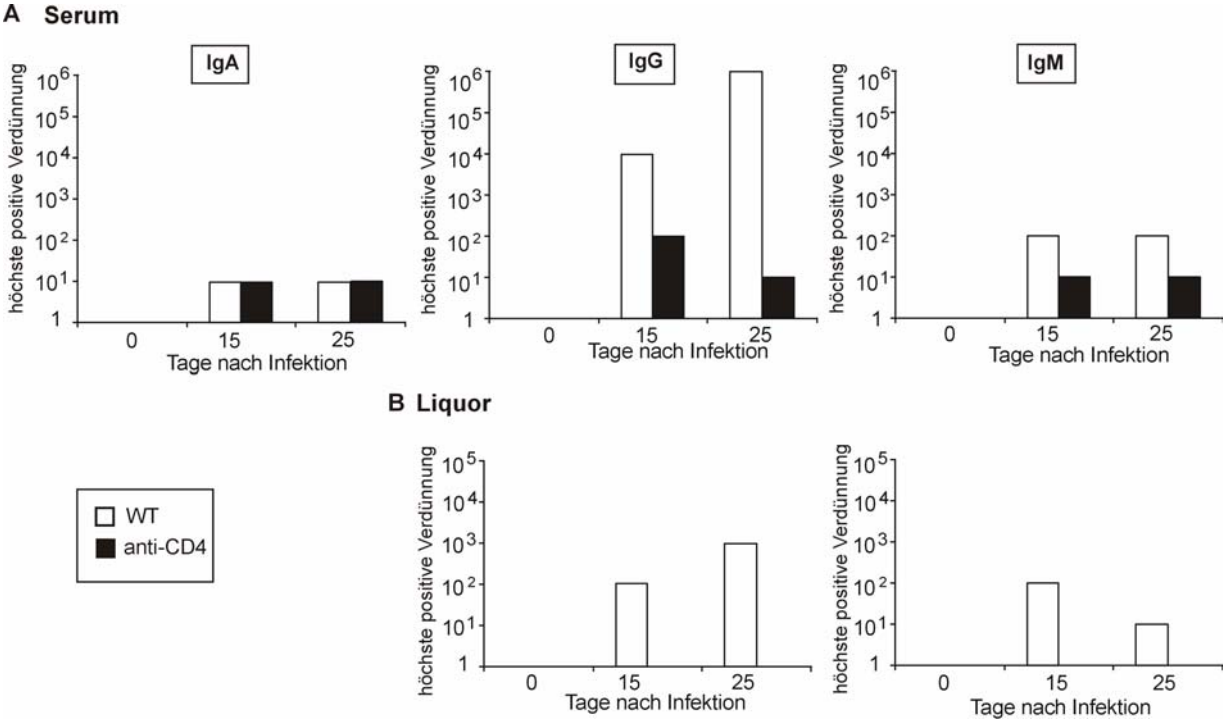


Abb. 3.16 Nachweis von* T.gondii-*spezifischen Antikörpern im Serum und Liquor. Serum und Liquor von *T.gondii*-infizierten, CD4-depletierten und nicht-depletierten Mäusen wurde aus sechs Tieren pro Gruppe am Tag 0, 15 und 25 nach Infektion gewonnen, gepoolt und seriell verdünnt (10^1 – 10^6). *T.gondii*-sepzifische IgG und IgM Antikörper des Liquors (A) sowie *T.gondii*-spezifische IgG, IgM und IgA Antikörper des Serums (A) wurden im ELISA nachgewiesen und die höchste positive Verdünnung bestimmt. Zwei weitere Experimente führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.2.1.6 Bestimmung der Überlebensrate von CD4-depletierten CB6-Mäuse nach Behandlung mit T.gondii-*spezifischem Immunserum*

CD4-depletierte Mäuse sind in der Produktion *T.gondii*-spezifischer Antikörper stark eingeschränkt (Abb. 3.16). Daher wurde überprüft, in wie weit die Behandlung mit *T.gondii*-spezifischen Antikörpern *T-gondii*-infizierte, CD4-depletierte Mäuse vor dem Tod durch eine TE schützt. Für die Antikörperbehandlung wurden Seren aus *T.gondii*-infizierten Tieren gewonnen und das Immunserum einmal pro Woche intravenös infizierten, CD4-depletierten Mäusen appliziert. Kontrolltiere waren CD4-depletierte Mäuse und nicht-depletierte Tiere, die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurden. Wie die Ergebnisse deutlich machen, konnte durch die Behandlung mit *T.gondii*-spezifischem Immunserum in infizierten CD4-depletierten Mäusen ein partieller Schutz vermittelt werden. So überlebten 50% der CD4-depletierten Mäuse, die mit Immunserum behandelt wurden, die Infektion, während 83% der CD4-depletierten Kontrolltiere bis zum Tag 28 verstarben (Abb. 3.17). Es konnte ausgeschlossen werden, dass protektive Effekte des Immunserums durch IFN-γ vermittelt wurden, da mittels ELISA kein IFN-γ nachgewiesen wurde (Daten sind nicht gezeigt).

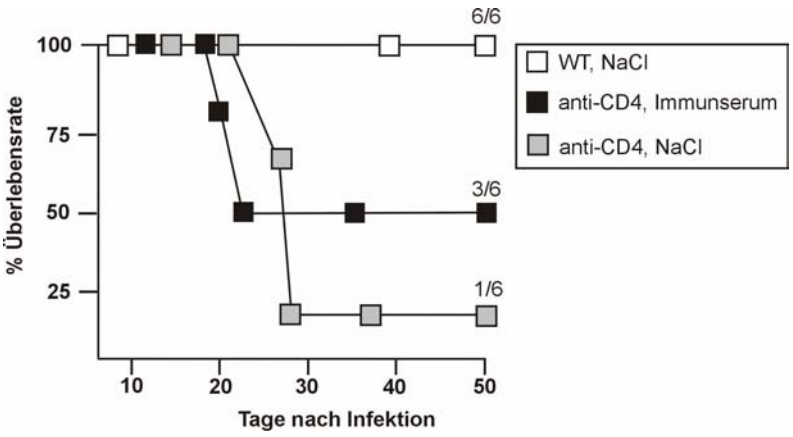


Abb. 3.17 Untersuchung zur protektiven Wirkung* T.gondii*-spezifischer Antikörper.
T.gondii-spezifisches Immunserum wurde aus *T.gondii*-infizierten CB6 Mäusen gewonnen.
Am Tag 7 nach Infektion wurde CD4-depletierten CB6-Mäusen (anti-CD4) *T.gondii*-spezifisches Immunserum i.v. injiziert und die Behandlung wöchentlich fortgesetzt. Kontrolltiere waren infizierte CD4-depletierte CB6-Mäuse und nicht-depletierte Kontrolltiere (WT), denen physiologische Kochsalzlösung i.v. appliziert wurde. Die Überlebensrate wurde für sechs Mäuse pro Gruppe bestimmt. In einem zweiten Versuch wurden ähnliche Ergebnisse gewonnen.

3.2.1.7 Bestimmung der TNF-α Produktion von zerebralen Makrophagen und Mikroglia

Ob durch das Fehlen $CD4^+$ T-Zellen aktivierte Makrophagen und Mikroglia in ihrer Funktion eingeschränkt sind, wurde über die TNF-α Produktion ermittelt. In der Milz kam es nach einer *T.gondii*-Infektion in CD4-depletierten und nicht-depletierten Mäusen nur zu einer geringen Induktion der TNF-α Produktion in Makrophagen. Dabei wiesen am Tag 25 nach Infektion Makrophagen von CD4-depletierten Mäusen im Vergleich zum WT eine verstärkte Bildung dieses Zytokins auf (Abb. 3.18 A). Im Gehirn dagegen stieg die TNF-α Produktion der Makrophagen nach Infektion in beiden Gruppen erheblich an. Insbesondere am Tag 45 nach Infektion war die TNF-α Produktion CD4-depletierter Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Auch die Mikroglia beider Gruppen zeigte eine verstärkte TNF-α Produktion nach Infektion. Der prozentuale Anteil der TNF-α Produktion der Mikroglia war für CD4-depletierte und nicht-depletierte Tiere vergleichbar (Abb. 3.18 B). In nicht-infizierten (Tag 0), CD4-depletierten Mäusen wies die Mikroglia im Vergleich zum WT eine erniedrigte TNF-α Produktion auf (Abb. 3.18 B).

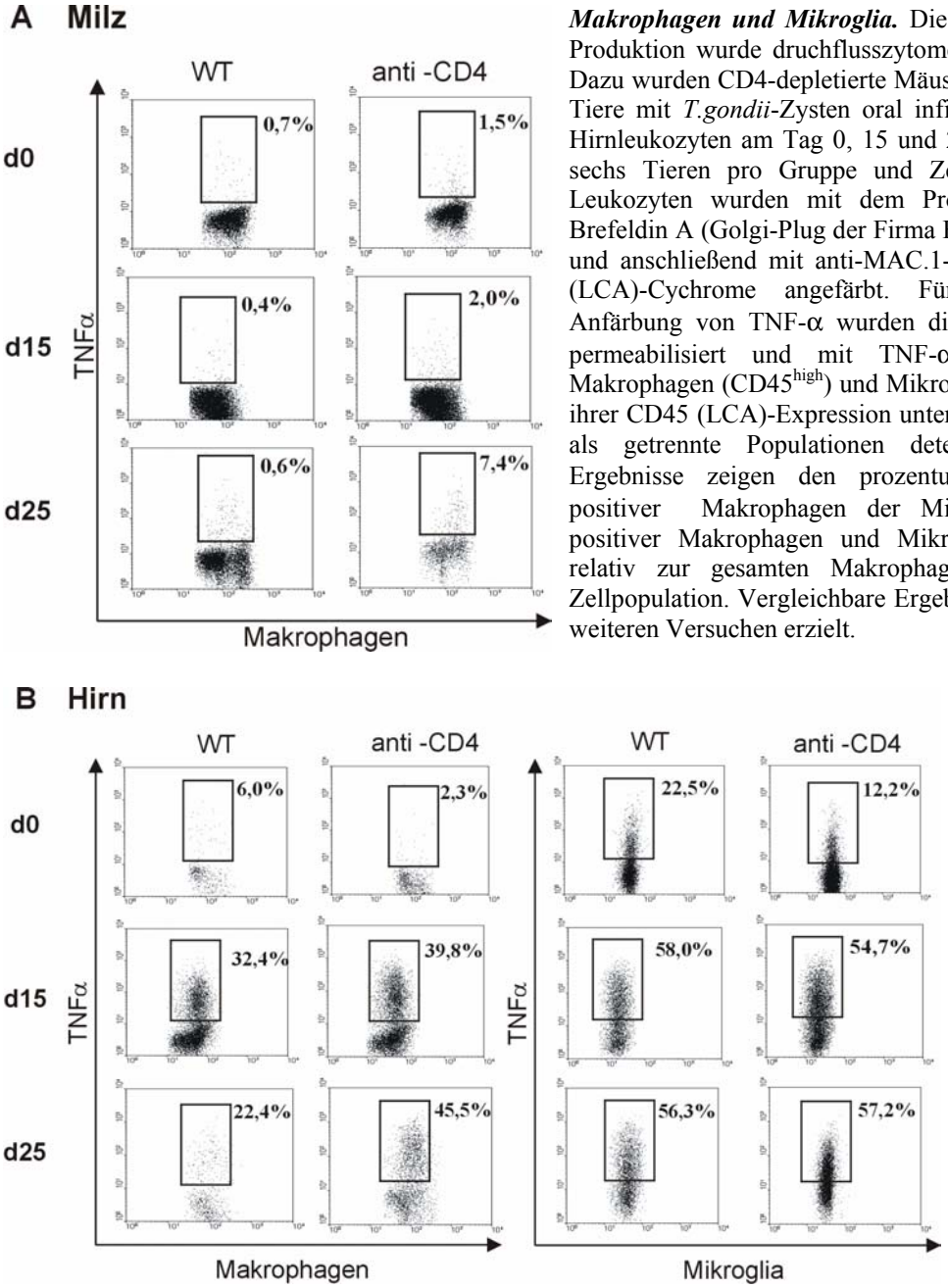


Abb. 3.18 Nachweis der TNF-α Produktion von Makrophagen und Mikroglia. Die intrazelluläre TNF-α Produktion wurde druchflusszytometrisch nachgewiesen. Dazu wurden CD4-depletierte Mäuse (anti-CD4) und WT Tiere mit *T.gondii*-Zysten oral infiziert und Milz- und Hirnleukozyten am Tag 0, 15 und 25 nach Infektion aus sechs Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt isoliert. Die Leukozyten wurden mit dem Proteintransportinhibitor Brefeldin A (Golgi-Plug der Firma BD; 1 µl/ml) inkubiert und anschließend mit anti-MAC.1-FITC und anti-CD45 (LCA)-Cychrome angefärbt. Für die intrazelluläre Anfärbung von TNF-α wurden die Leukozyten fixiert, permeabilisiert und mit TNF-α-PE angefärbt. Da Makrophagen ($CD45^{high}$) und Mikroglia ($CD45^{low}$) sich in ihrer CD45 (LCA)-Expression unterscheiden, konnten sie als getrennte Populationen detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen den prozentualen Anteil TNF-α positiver Makrophagen der Milz (A) und TNF-α positiver Makrophagen und Mikroglia des Hirns (B) relativ zur gesamten Makrophagen- bzw. Mikroglia Zellpopulation. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zwei weiteren Versuchen erzielt.

3.2.1.8 Untersuchung der MHC Kl. II-Expression zerebraler Makrophagen und Mikroglia

Aktivierte Makrophagen exprimieren verstärkt MHC Kl. II und auf der Mikroglia wird die MHC Kl. II-Expression nach einer *T.gondii*-Infektion *de novo* induziert (Schlüter *et al*., 2001, Deckert-Schlüter *et al*., 1994). Daher wurde neben der TNF-α Produktion die Aktivierung der Makrophagen und Mikroglia durchflusszytometrisch über die MHC Kl. II-Expression am Tag 0 und 15 nach Infektion im Hirn CD4-depletierter und nicht-depletierter Mäuse bestimmt. Beide Gruppen zeigten eine starke Induktion der MHC Kl. II-Expression auf der Mikroglia

und eine verstärkte Bildung von MHC Kl. II auf zerebralen Makrophagen (Abb. 3.19). Dabei war die Expression von MHC Kl. II auf zerebralen Makrophagen CD4-depletierter Mäuse nicht vermindert, sondern war im Vergleich zu nicht-depletierten Kontrolltieren leicht erhöht. Die MHC Kl. II-Expression der Mikroglia CD4-depletierter Mäuse war im Vergleich zur Kontrollgruppe nur leicht reduziert (Abb. 3.19).

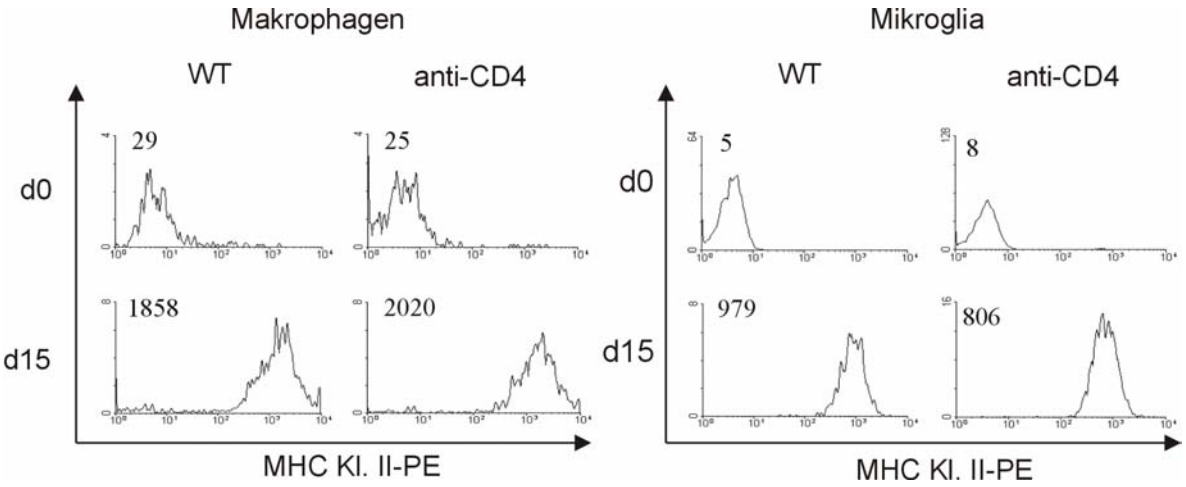


Abb. 3.19 MHC Kl. II-Expression zerebraler Makrophagen und Mikroglia. Die Leukozyten aus dem Hirn CD4-depletierter und nicht-depletierter Mäuse wurden am Tag 0 und 15 nach *T.gondii*-Infektion aus sechs Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt gewonnen. Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Hirnleukozyten wurden die Zellen mit anti-MAC.1, anti-CD45 (LCA)-Cychrome und anti-IA/IE (MHC Kl. II)-PE angefärbt. Durch ihre unterschiedliche CD45-Expression konnten Mikroglia ($CD45^{low}$) und Makrophagen ($CD45^{high}$) im Hirn als getrennte Populationen detektiert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind als Histogramm dargestellt, welches die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der MHC Kl. II-Expression auf Makrophagen und Mikroglia wiedergibt.

3.2.2 Untersuchung T.gondii-*infizierter MHC Kl. II-defizienter Mäuse, CD4-depletierter MHC Kl. II-defizienter Mäuse und CD4-depletierter WT-Tiere*

$CD4^+$ T-Zellen wurden neben *T.gondii*-resistenten auch in *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen bei der Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort funktionell charakterisiert. Daher wurden *T.gondii*-suszeptible, MHC Kl. II-defiziente C57BL/6 ($H\text{-}2^b$) Mäuse, die aufgrund ihrer MHC Kl. II-Defizienz keine konventionellen $CD4^+$ T-Zellen besitzen (Köntgen *et al*., 1993) sowie CD4-depletierte C57BL/6 (WT) Mäuse in die Untersuchungen einbezogen. Bei einem Teil der Untersuchungen wurden darüber hinaus CD4-depletierte MHC Kl. II-defiziente Mäuse verwendet, um zu überprüfen, ob die Depletion von nicht-konventionellen $CD4^+$ T-Zellen MHC Kl. II-defiziente Mäuse zusätzlich in ihrer Immunantwort beeinträchtigt.

Für die Depletion $CD4^+$ T-Zellen wurden MHC Kl. II-defiziente Mäuse und C57BL/6 (WT)-Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen vor Infektion sowie während des laufenden Versuchs mit anti-CD4 monoklonalen Antikörpern behandelt. Für die Infektion wurden Zysten des schwach-virulenten *Toxoplasma*-Stamms ME49 intraperitoneal (i.p.) injiziert. Eine orale Infektion *T.gondii*-suszeptibler C57BL/6 Mäuse ist nicht möglich, da diese schon früh an der Infektion versterben (eigene Beobachtung). Der Nachweis der CD4-Depletion wurde durchflusszytometrisch erbracht. Sowohl am Tag 15 als auch am Tag 30 nach Infektion führte die Depletion zum Verlust der $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 3.20).

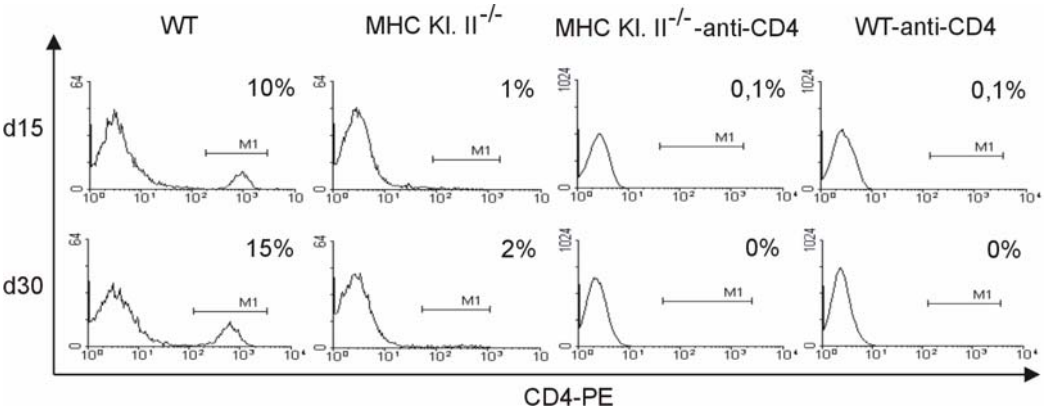


Abb. 3.20 Durchflusszytometrischer Nachweis der CD4-Depletion von CD4-depletierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen und CD4-depletierten WT-Tieren. Für die Depletion wurden MHC Kl. II-defiziente Mäuse und WT-Tiere (C57BL/6) an drei aufeinanderfolgenden Tagen monoklonale anti-CD4-Antikörper (Klon GK1.5; 0,5mg/Maus) i.p. appliziert und die Behandlung nach Infektion alle drei bis vier Tage bis zum Versuchsende weitergeführt. Leukozyten der Milz von CD4-depletierten (anti-CD4) und nicht-depletierten Kontrolltieren wurden am Tag 15 und 30 nach Infektion (ME49) isoliert und für den durchflusszytometrischen Nachweis der CD4-Depletion mit CD4-PE angefärbt. Die Ergebnisse geben den prozentualen Anteil $CD4^+$ T-Zellen vor und nach einer CD4-Depletion an, relativ zur gesamten Leukozytenpopulation.

3.2.2.1 Bestimmung der Überlebensrate von T.gondii-*infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen und CD4-depletierten, MHC Kl.II-defizienten Mäusen sowie CD4-depletierten WT-Mäusen und nicht-depletierten WT-Tieren*

Um zu überprüfen, ob MHC Kl. II-defiziente Mäuse und CD4-depletierte, MHC Kl. II-defiziente Mäuse sowie CD4-depletierte WT-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren in ihrer Immunantwort beeinträchtigt sind, wurden die Tiere mit *T.gondii* (ME49) i.p. infiziert und die Überlebensrate bestimmt. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe verstarben MHC Kl. II-defiziente Mäuse, CD4-depletierte MHC Kl. II-defiziente Mäuse und CD4-depletierter WT-Mäuse bis zum Tag 45 nach Infektion. Dabei unterschieden sich die einzelnen experimentellen Gruppen nicht wesentlich in ihrer Überlebensrate. WT-Tiere überlebten die Infektion bis über den Tag 70 hinaus (Abb. 3.21).

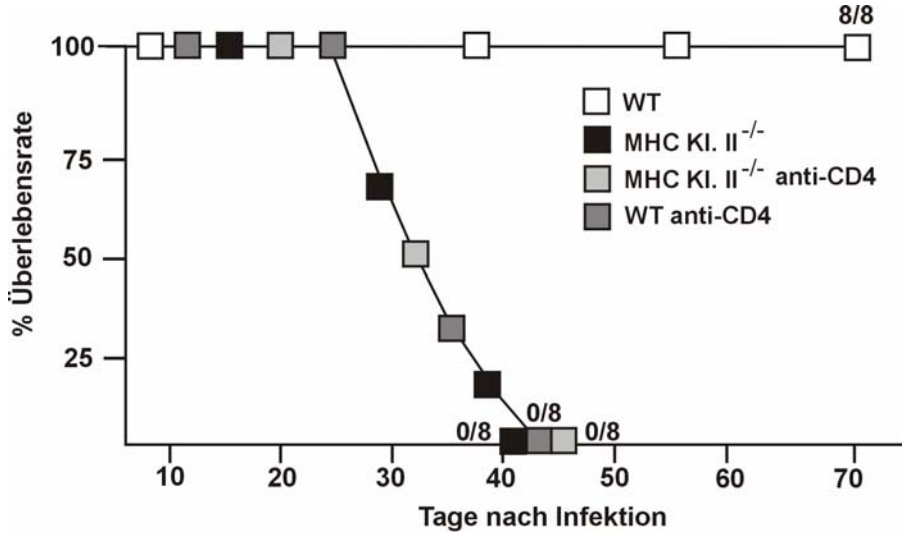


Abb. 3.21 Bestimmung der Überlebensrate von* T.gondii-*infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen und CD4-depletierten WT-Tieren. $CD4^+$ T-Zellen wurden vor Infektion in MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Tieren depletiert und die Depletion bis zum Versuchsende weitergeführt. Für die Infektion wurden Zysten des schwach-virulenten *Toxoplasma*-Stamms ME49 MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten WT-Mäusen und nicht-depletierten WT-Tieren i.p. injiziert und die Überlebensrate für acht Tiere pro Gruppe bestimmt. Die Versuchsergebnisse wurden durch ein zweites Experiment bestätigt.

3.2.2.2 Histologischer Nachweis von intrazerebralen Toxoplasmen

Toxoplasmen wurden immunhistologogisch durch die indirekte Immunperoxidase-Methode im Hirn infizierter (Tag 30), MHC Kl. II-defizienter Mäuse und CD4-depletierter MHC Kl. II-defizienter Mäuse sowie CD4-depletierter WT-Mäuse und WT-Tiere nachgewiesen. Die histologischen Untersuchungen machten deutlich, dass MHC Kl. II-defiziente Mäuse, CD4-depletierte, MHC Kl. II-defiziente Mäuse sowie CD4-depletierte WT-Tiere eine nekrotisierende TE entwickelten. Am Tag 30 nach Infektion war im Vergleich zu WT-Tieren in allen anderen experimentellen Gruppen der Parasitengehalt im Gehirn *T.gondii*-infizierter Mäuse stark erhöht. Da MHC Kl. II-defiziente Mäuse, CD4-depletierte MHC Kl. II-defiziente Mäuse und CD4-depletierte WT-Tiere sich im Toxoplasmagehalt nicht signifikant voneinander unterschieden ($p > 0.05$), ist der histologische Nachweis der Toxoplasmen nur für MHC Kl. II-defiziente Mäuse (a) im Vergleich zu WT-Tieren (b) dargestellt (Abb. 3.22). Die Anzahl der Toxoplasmen wurde durch die Auszählung von 50 hochaufgelösten, mikroskopischen Ausschnitten bestimmt. Während am Tag 30 nach Infektion MHC Kl. II-defiziente Mäuse 30 ($\pm$ 5,6) intrazerebrale Zysten/mikroskopischen Ausschnitt aufwiesen, betrug die Anzahl der intrazerebralen Zysten in WT-Mäusen 16 ($\pm$2,3)/ mikroskopischem Ausschnitt.

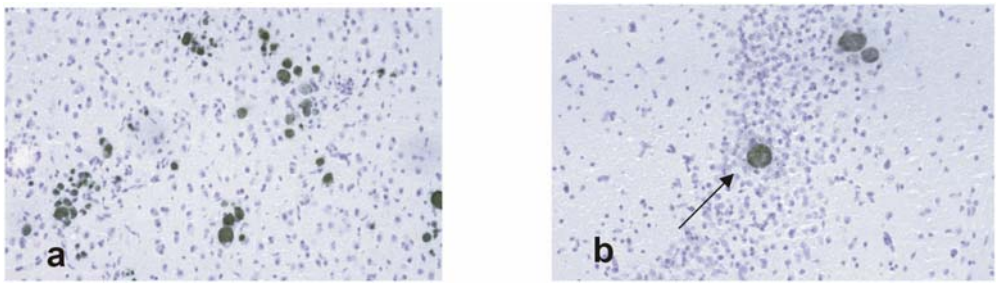


Abb. 3.22 Histologischer Nachweis intrazerebraler Toxoplasmen in* T.gondii-*infizierten MHC Kl. II-defizienten und WT-Mäusen. Der immunhistologischen Nachweis wurde über die indirekte Immunperoxidase-Methode erbracht. Intrazerebrale Toxoplasmen wurden durch die Verwendung von polyklonalem anti-*T.gondii* Antiserum auf schockgefrorenen Kryostatschnitten detektiert. Als chromogenes Substrat diente AEC. Hämalaun wurde für die Gegenfärbung verwendet. Die Ergebnisse zeigen den immunhistologischen Nachweis von intrazerebralen *Toxoplasma*-Zysten in MHC Kl. II-defizienten Mäusen (a) und WT-Tieren (b) am Tag 30 nach Infektion. Der Pfeil markiert eine *Toxoplasma*-Zyste.

3.2.2.3 IFN-γProduktion von CD8$^+$ T-Zellen

CD8$^+$ Effektorzellen wirken insbesondere über die Bildung des Zytokins IFN-γ gegen eine *T.gondii*-Infektion protektiv (Denkers & Gazzinelli, 1998). Ob CD8$^+$ T-Zellen in *T.gondii*-infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen und CD4-depletierten, MHC Kl. II- defizienten Mäusen sowie CD4-depletierten WT-Mäusen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, wurde daher über die Bildung von IFN-γ bestimmt. Die IFN-γ Produktion von CD8$^+$ T-Zellen der Milz wurde intrazellulär in den genannten Gruppen sowie in WT-Kontrolltieren am Tag 15 und 30 nach Infektion durchflusszytometrisch nachgewiesen. Darüber hinaus wurde die IFN-γ Produktion von CD8$^+$ T-Zellen in MHC Kl. II-defizienten und C57BL/6 (WT) Kontrolltieren für das Hirn am Tag 15 und 30 nach Infektion ermittelt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass in Milz und Hirn CD8$^+$ T-Zellen aller CD4-defizienter Gruppen in ihrer IFN-γ Produktion nicht beeinträchtigt sind. So wiesen CD8$^+$ T-Zellen der Milz von MHC Kl. II defizienten Mäusen am Tag 15 nach Infektion eine vergleichbare IFN-γ-Produktion zu WT-Tieren auf. CD8$^+$ T-Zellen von CD4-depletierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen zeigten am Tag 15 nach Infektion sogar eine erhöhte IFN-γ Produktion im Vergleich zu nicht-depletierten MHC Kl. II defizienten Mäusen. Auch in CD4-depletierten WT-Tieren war im Vergleich zur nicht-depletierten Kontrollgruppe die IFN-γ Produktion von CD8$^+$ T-Zellen erhöht. Am Tag 30 waren keine wesentlichen Unterschiede im prozentualen Anteil der IFN-γ Produktion CD8$^+$ T-Zellen zwischen den Gruppen ersichtlich (Abb. 3.23 A).

Auch im Hirn waren $CD8^+$ T-Zellen aus MHC Kl. II-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe in ihrer IFN-γ Produktion nicht beeinträchtigt und zeigten am Tag 30 nach Infektion eine verstärkte IFN-γ Produktion (Abb. 3.23 B).

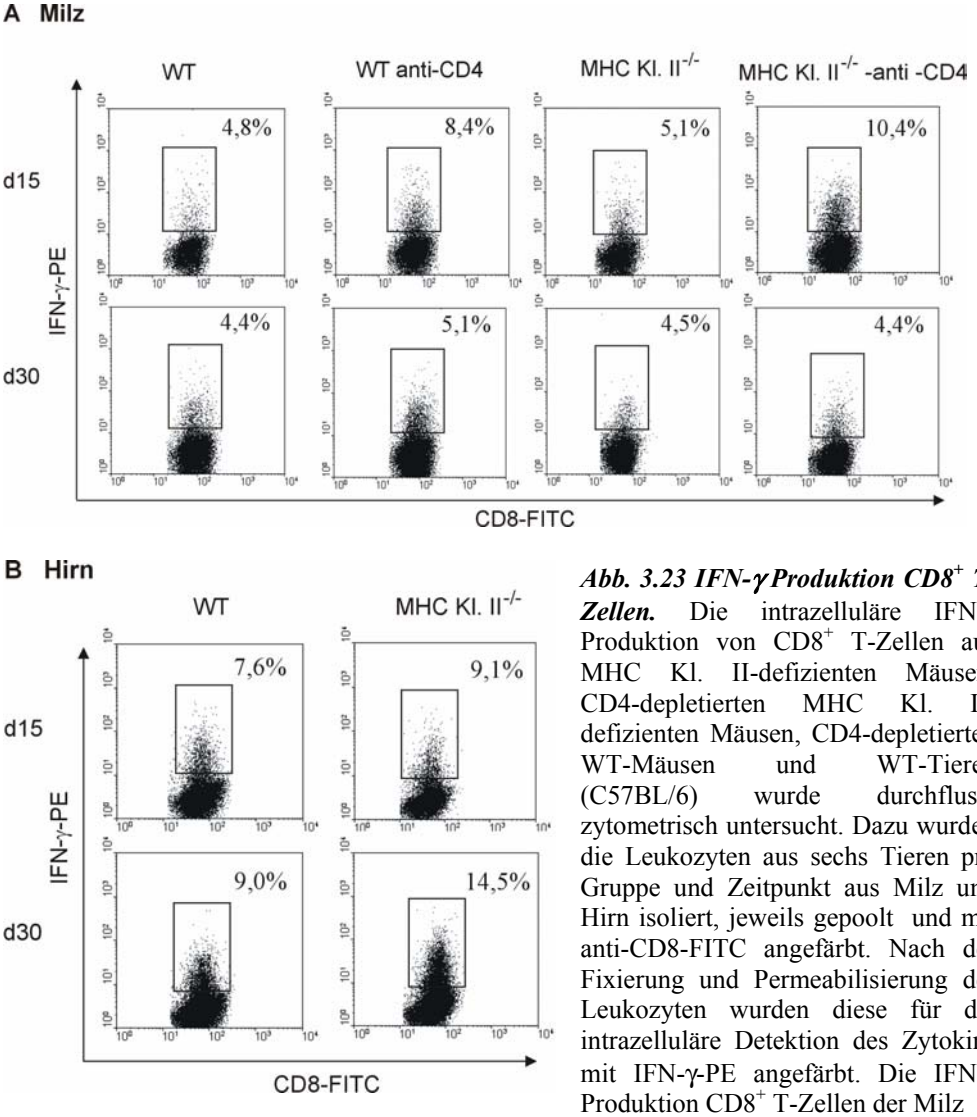


Abb. 3.23 IFN-γ Produktion $CD8^+$ T-Zellen. Die intrazelluläre IFN-γ Produktion von $CD8^+$ T-Zellen aus MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten WT-Mäusen und WT-Tieren (C57BL/6) wurde durchfluss-zytometrisch untersucht. Dazu wurden die Leukozyten aus sechs Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt aus Milz und Hirn isoliert, jeweils gepoolt und mit anti-CD8-FITC angefärbt. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Leukozyten wurden diese für die intrazelluläre Detektion des Zytokins mit IFN-γ-PE angefärbt. Die IFN-γ Produktion $CD8^+$ T-Zellen der Milz wurde am Tag15 und 30 nach *T.gondii*-Infektion in MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten WT-Mäusen und WT-Tieren (C57BL/6) untersucht (A). Im Hirn wurden IFN-γ-produzierende $CD8^+$ T-Zellen am Tag 15 und 30 nach Infektion in MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Tieren analysiert (B). Die Ergebnisse zeigen den prozentualen Anteil IFN-γ positiver CD8 T-Zellen relativ zur gesamten $CD8^+$ T-Zellpopulation. Zwei weitere Untersuchungen führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

3.2.2.4 Nachweis T.gondii-*spezifischer Antikörper im Serum*

$CD4^+$ T-Zellen können aktivierend auf B-Zellen wirken, die daraufhin spezifische Antikörper bilden. Ob $CD4^+$ T-Zellen auch über die Induktion einer humoralen Immunantwort zur Resistenz gegen *T.gondii* beitragen, wurde in MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-

depletierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen und CD4-depletierten WT-Mäusen untersucht. Dazu wurden die Seren aus den genannten Gruppen sowie aus nicht-depletierten WT-Tieren am Tag 0, 15 und 30 nach Infektion gewonnen und die Bildung *T.gondii*-spezifischer IgG, IgM und IgA Antikörper mittels ELISA bestimmt.

MHC Kl. II-defiziente Mäuse, CD4-depletierte MHC Kl. II defiziente Mäuse und CD4-depletierte WT-Mäuse waren in ihrer spezifischen Antikörperantwort im Vergleich zum WT stark beeinträchtigt. Insbesondere die Bildung *T.gondii*-spezifischer IgG Antikörper war erheblich reduziert. So wiesen am Tag 15 nach Infektion MHC Kl. II-defiziente Mäuse und CD4-depletierte MHC Kl. II-defiziente Mäuse eine 100fache Reduktion ihrer IgG-Antikörperproduktion und CD4-depletierte WT-Mäusen eine 10fache Reduktion im Vergleich zum WT auf. Am Tag 30 nach Infektion dagegen war die IgG-Produktion aller untersuchten Gruppen im Vergleich zum WT um das 10.000fache reduziert (Abb. 3.24). Auch die Bildung *T.gondii*-spezifischer IgM-Antikörper war insbesondere am Tag 30 nach Infektion im Vergleich zum WT erheblich eingeschränkt. Für MHC Kl. II-defiziente Mäuse sowie CD4-depletierte, MHC Kl. II-defiziente Mäuse waren mittels ELISA keine IgM Antikörper am Tag 30 nach Infektion nachweisbar. CD4-depletierte WT-Mäuse zeigten eine 100fache Reduktion der IgM Antikörper im Vergleich zum WT (Abb. 3.24). Im Gegensatz zu allen anderen Gruppen konnten *T.gondii*-spezifische IgA Antikörper am Tag 15 und 30 nach Infektion nur für die WT-Kontrolltiere nachgewiesen werden (Abb. 3.24).

Im Serum nicht-infizierter Tiere wurden für alle experimentellen Gruppen keine *T.gondii*-spezifischen Antikörper detektiert.

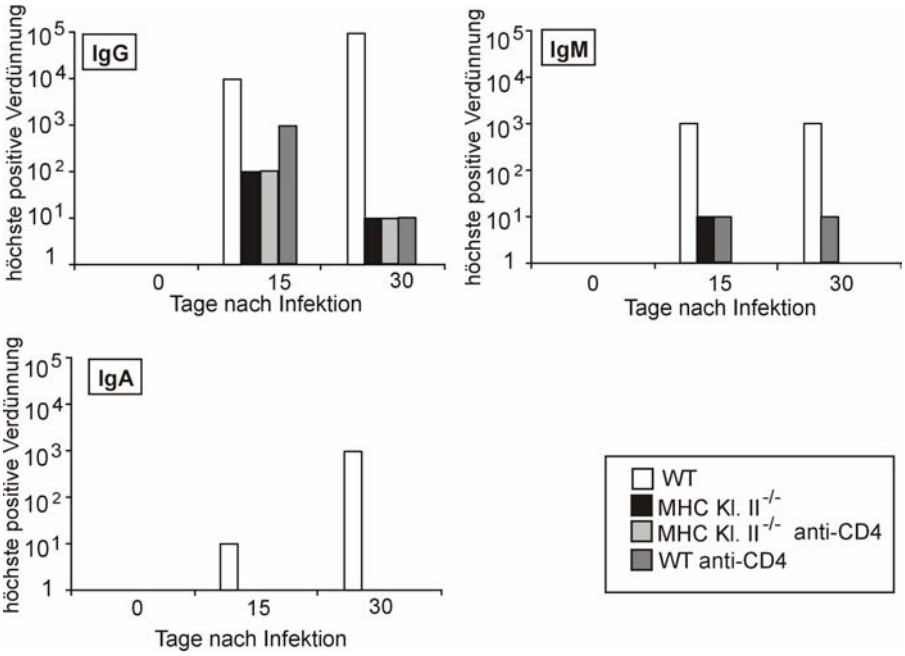


Abb. 3.24 Bestimmung* T.gondii-*spezifischer Antikörper.
Die Bildung *T.gondii*-spezifischer Antikörper wurde im Serum von MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen, CD4-depletierten WT-Mäusen und WT-Tieren am Tag 0, 15 und 30 nach *T.gondii*-Infektion analysiert. Das Serum wurde aus sechs Tieren pro Gruppe gewonnen, gepoolt, seriell verdünnt (10^1 - 10^6) und mittels ELISA *T.gondii*-spezifische IgG, IgM und IgA Antikörper nachgewiesen.

Dargestellt ist die höchste positive Verdünnung. Vergleichbare Ergebnisse wurden durch zwei weitere Versuche gewonnen.

3.2.2.5 Einfluss **T.gondii-***spezifischer Antikörper auf das Überleben T.gondii-infizierter, MHC Kl. II-defizienter Mäuse*

T.gondii-spezifische Antikörper sind in MHC Kl. II-defizienten Mäusen stark reduziert (Abb. 3.24). Daher wurde untersucht, ob die Behandlung von *T.gondii*-infizierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen mit *T.gondii*-spezifischen Antikörpern einen Schutz vermittelt und sich verlängernd auf das Überleben dieser Mäuse auswirkt. Dazu wurden Seren aus infizierten (*Toxoplasma*-Immunserum) und nicht-infizierten (nicht-Immunserum) WT-Mäusen gewonnen. Für die Antikörperbehandlung wurde *T.gondii*-infizierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen *Toxoplasma*-Immunserum, beginnend am Tag 7 nach Infektion, wöchentlich intravenös (i.v.) appliziert. Kontrolltiere waren infizierte MHC Kl. II-defiziente Mäuse, denen nicht-Immunserum i.v. injiziert wurde sowie mit physiologische Kochsalzlösung behandelte, infizierte WT-Mäuse.

Infizierte MHC Kl. II-defiziente Mäuse, die mit *Toxoplasma*-Immunserum behandelt wurden, überlebten deutlich länger, nämlich bis zum Tag 60, während *T.gondii*-infizierte MHC Kl. II-defiziente Kontrolltiere, die mit nicht-Immunserum behandelt wurden, bis zum Tag 45 nach Infektion verstarben. *T.gondii*-infizierte WT-Mäuse, denen über den gleichen Zeitraum physiologische Kochsalzlösung appliziert wurde, überlebten die Infektion über den Tag 60 hinaus (Abb. 3.25). Um auszuschließen, dass der protektive Effekt des Immunserums durch IFN-γ vermittelt wurde, wurde der IFN-γ Gehalt mittels ELISA bestimmt. Im Immunserum sowie im nicht-Immunserum war kein IFN-γ nachweisbar (Daten sind nicht gezeigt).

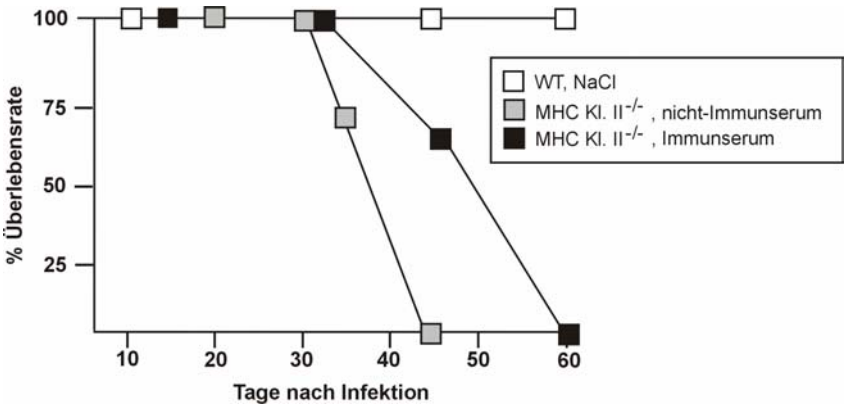


Abb. 3.25 Einfluss* T.gondii-*spezifischer Antikörper auf die Überlebensrate infizierter MHC Kl. II-defizienter Mäuse. *T.gondii*-spezifisches Immunserum wurde aus *T.gondii*-infizierten WT-Tieren (C57BL/6) und nicht-Immunserum aus nicht-infizierten WT-Tieren gewonnen. MHC Kl. II-defiziente Mäuse und WT-Tiere wurden mit Zysten des schwach-virulenten *Toxoplasma*-Stamms ME49 i.p. infiziert. Um zu überprüfen ob *T.gondii*-spezifische Antikörper in MHC Kl. II-defizienten Mäusen protektiv wirken, wurde MHC KL. II-defizienten Mäusen Immunserum am Tag 7 nach Infektion i.v. appliziert und die Behandlung wöchentlich bis zum Versuchsende fortgesetzt. Kontrolltiere waren infizierte MHC KL. II-defiziente Mäuse, die mit nicht-Immunserum, und WT-Mäuse, die mit physiologische Kochsalzlösung behandelt wurden. Die Überlebensrate wurde aus sechs Mäusen pro Gruppe bestimmt. Die Ergebnisse eines weiteren Versuchs waren mit den hier gezeigten Daten vergleichbar.

3.2.2.6 Funktionelle Charakterisierung von nicht-konventionellen, CD4$^+$ T-Zellen in MHC Kl. II- defizienten Mäusen

Obwohl MHC Kl. II-defiziente Mäuse keine MHC Kl. II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, besitzen sie doch eine kleine Population MHC Kl. II-unabhängiger CD4$^+$ T-Zellen. Diese nicht-konventionellen CD4$^+$ T-Zellen werden im Thymus CD1-abhängig selektioniert und produzieren nach Aktivierung mit CD1 und/oder anti-CD3 IFN-γ (Cardell *et al*., 1995, Bendelac *et al*., 1997, Chen & Paul, 1998). Ob nicht-konventionelle CD4$^+$ T-Zellen auch bei der murinen Toxoplasmose CD1-abhängig IFN-γ produzieren und so einen Schutz vermitteln, ist bisher nicht bekannt. Daher wurde in dieser Studie die IFN-γ Produktion und CD1-Restriktion nicht-konventioneller CD4$^+$ T-Zellen in *T.gondii*-infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen ermittelt.

3.2.2.6.1 IFN-γProduktion nicht-konventioneller CD4$^+$ T-Zellen

Die intrazelluläre IFN-γ Produktion von CD4$^+$ T-Zellen der Milz in infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Kontrolltieren wurde am Tag 15 nach Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. Nicht-konventionelle CD4$^+$ T-Zellen aus *T.gondii*-infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen waren funktionell aktiv und produzierten IFN-γ. Dabei war der prozentuale Anteil der IFN-γ Produktion von CD4$^+$ T-Zellen mit dem des WT vergleichbar (Abb. 3.26).

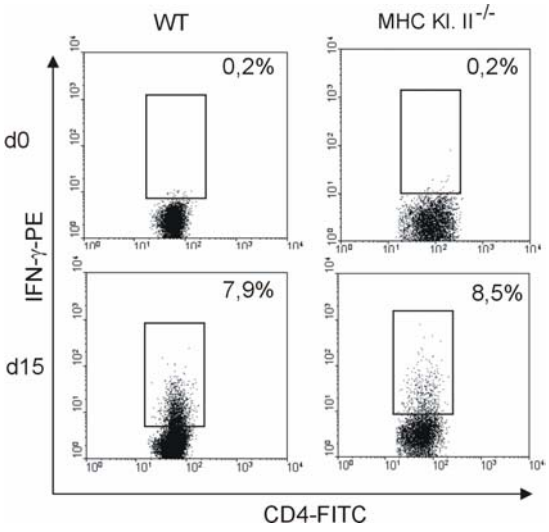


Abb. 3.26 Bestimmung der IFN-γ Produktion von nicht-konventionellen CD4$^+$ T-Zellen aus* T.gondii-*infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen. Leukozyten der Milz wurden aus *T.gondii*-infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Tieren am Tag 0 und 15 nach Infektion isoliert und CD4$^+$ T-Zellen über die immunomagnetische Seperation (MACS-System) angereichert. Die intrazelluläre IFN-γ Produktion wurde durchflussszytometrisch nachgewiesen. Die Leukozyten wurden zunächst mit anti-CD4-FITC angefärbt. Für die intrazelluläre Detektion des Zytokins wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und schließlich mit IFN-γ-PE angefärbt. Die Ergebnisse, die durch eine ein weiteren Versuch bestätigt wurden, geben den prozentualen Anteil der IFN-γ Produktion relativ zur gesamten CD4$^+$ T-Zellpopulation an.

3.2.2.6.2 CD1-Restriktion nicht-konventioneller CD4$^+$ T-Zellen

Für die Untersuchung wurden CD4$^+$ T-Zellen der Milz aus *T.gondii*-infizierten (d15) und nicht-infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Tieren mit dem MACS-System angereichert (Abb. 3.27 A). Als antigenpräsentierende Zellen (APZ) wurden CD1-transfizierte L-Zellen verwendet, die im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen verstärkt CD1 exprimierten. Beide Zelltypen waren außerdem MHC Kl. I, aber nicht MHC Kl. II positiv (Abb. 3.27 B). Die CD1-Restriktion von CD4$^+$ T-Zellen aus MHC Kl. II-defizienten Mäusen wurde über die IFN-γ Produktion mittels ELISA ermittelt. Mit HKT-Antigen restimulierte, nicht-konventionelle CD4$^+$ T-Zellen aus MHC Kl. II-defizienten Mäusen zeigten im Gegensatz zu CD4$^+$ T-Zellen aus WT-Tieren eine CD1-abhängige IFN-γ Produktion. So synthetisierten nicht-konventionelle CD4$^+$ T-Zellen die doppelte Menge an IFN-γ in der Präsens von CD1-transfizierten L-Zellen ($p < 0.05$). CD4$^+$ T-Zellen aus WT-Tieren dagegen bildeten sowohl in der Präsens CD1-transfizierter als auch nicht-transfizierter L-Zellen gleiche Mengen an IFN-γ. Wurden CD4$^+$ T-Zellen nicht-infizierter Tiere mit HKT restimuliert, wurde in beiden Gruppen keine IFN-γ Produktion nachgewiesen (Daten sind nicht in der Abbildung gezeigt). CD4$^+$ T-Zellen aus infizierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Tieren ließen sich unabhängig von einer CD1-Expression der APZ mit ConA, einem polyklonalen Mitogen, stimulieren. Dagegen zeigte sich in beiden Gruppen eine sehr geringe IFN-γ-Produktion, wenn CD4$^+$ T-Zellen nur mit Medium d.h. ohne *T.gondii*-Antigen oder ConA, kultiviert wurden (Abb. 3.27 C).

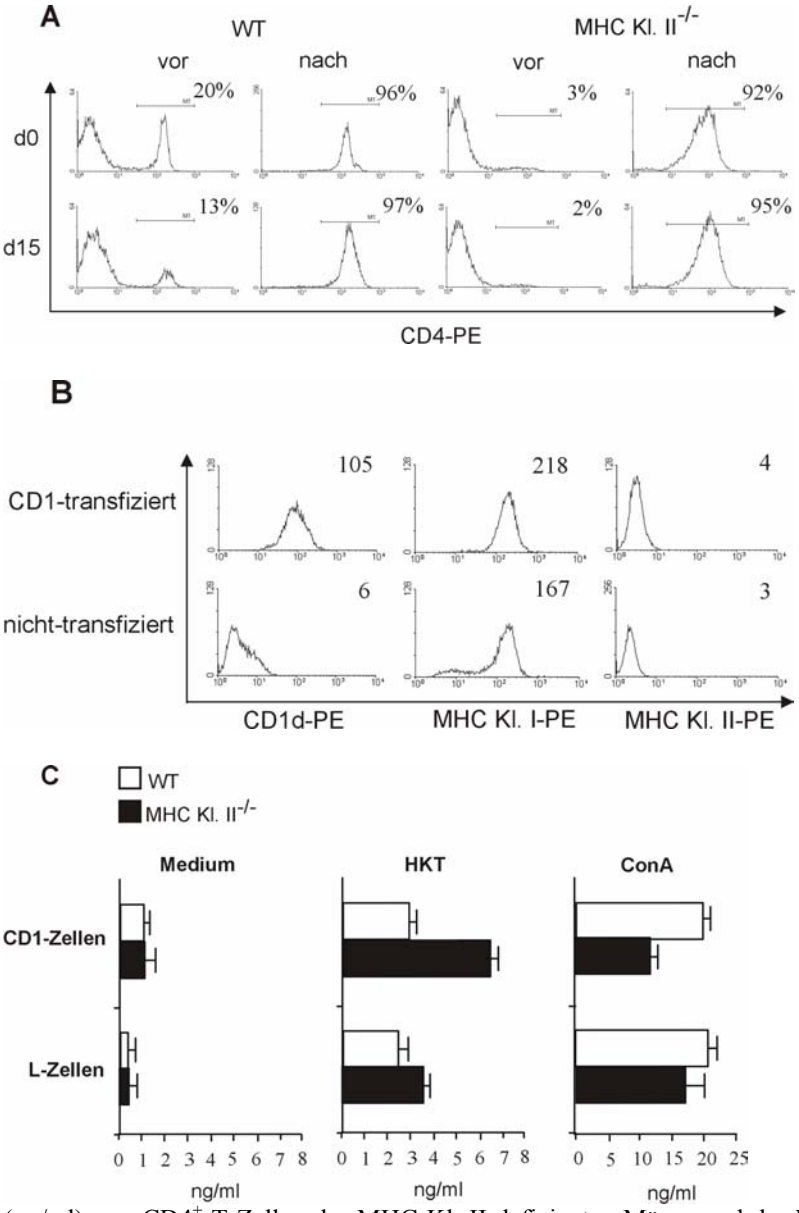


Abb. 3.27 Nachweis der CD1-Restriktion nicht-konventioneller CD4$^+$ T-Zellen von MHC Kl. II-defizienten Mäusen. Am Tag 15 nach *T.gondii*-Infektion wurden Leukozyten der Milz aus MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Tieren mittels der immunomagnetischen Seperation (MACS-System) angereichert. Der Erfolg der Anreicherung CD4$^+$ T- Zellen aus MHC Kl. II-defizienten Mäusen und WT-Tieren wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte geben den prozentualen Anteil der CD4$^+$ T-Zellen vor und nach der Anreicherung an (A). Als antigenpräsentierende Zellen (APZ) wurden CD1-transfizierte und nicht-transfizierte L-Zellen, deren CD1-Expression, sowie MHC KL. I und II-Expression vorher durchflusszytometrisch ermittelt wurde, eingesetzt. Die Ergebnisse sind als Histogramm dargestellt, das die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der CD1, MHC Kl.I oder MHC KL.II Expression von CD1-transfizierten und nicht-transfizierten L-Zellen wiedergibt (B). Die CD1-Restriktion wurde über die IFN-γ Produktion angereicherter CD4$^+$ T-Zellen mittels ELISA bestimmt. HKT ($2x10^6$ Toxoplasmen/ml) wurde als Antigen und ConA (5µg/ml) als polyklonales Mitogen verwendet. Dargestellt ist die IFN-γ Produktion (ng/ml) von CD4$^+$ T-Zellen der MHC Kl. II-defizienten Mäuse und der WT-Tiere ohne Stimulation (Medium) sowie nach HKT oder ConA Stimulation. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten (C).

4. Diskussion

4.1 Die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 bei der Toxoplasma-*Enzephalitis*

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 für eine effektive Immunantwort gegen einen Infektionserreger von entscheidender Bedeutung ist. *T.gondii*-infizierte, VCAM-1-defiziente Mäuse, in denen das VCAM-1-Gen durch eine IFN-α induzierbare Cre *loxP*-abhängige Deletion neonatal ausgeschaltet wurde, verstarben an einer chronischen, nekrotisierenden TE. VCAM-1-defiziente Mäuse waren aufgrund einer beeinträchtigten B- und T-Zellantwort sowie einer reduzierten Aktivität zerebraler Makrophagen und Mikroglia nicht in der Lage das Wachstum des intrazellulären Parasiten *T.gondii* zu kontrollieren. Die Rekrutierung inflammatorischer Leukozyten war dagegen in VCAM-1-defizienten Mäusen nicht reduziert.

Die verminderte Produktion *T.gondii*-spezifischer IgG und IgM durch B-Zellen ist nachweislich ein Grund für den letalen Verlauf *T.gondii*-infizierter VCAM-1-defizienter Mäuse. Untersuchungen B-Zell-defizienter Mäuse belegen, dass B-Zellen sowohl für die primäre Toxoplasmose als auch für die Resistenz gegen *T.gondii*, die durch eine Immunisierung induzierte wird, essentiell sind (Kang *et al*., 2000, Sayles *et al*., 2000). Ähnlich wie VCAM-1-defiziente Mäuse versterben auch B-Zell-defiziente Mäuse an einer nekrotisierenden TE. Möglicherweise ist die verminderte Bildung spezifischer IgG und IgM-Antikörper durch die beeinträchtigte B-Zellreifung in Lymphknoten und Milz in VCAM-1-defizienten Mäusen zu erklären (Koni *et al*., 2001). So ist das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 nicht nur für die Migration der Lymphozyten in das Knochenmark wichtig (Koni *et al*., 2001), sondern trägt auch über die Expression auf Endothelzellen und follikulären dendritischen Zellen zur B-Zellreifung bei (Leuker *et al*., 2001, Koopman *et al*., 1997, Koopman *et al*., 1994, Koopman *et al*., 1991, Freedman *et al*., 1990). Wahrscheinlich verursacht auch die fehlende VCAM-1-Expression auf den Endothelzellen und follikulären dendritischen Zellen in VCAM-1-defizienten Mäusen die erhöhte Anzahl unreifer B-Zellen im Serum (Leuker *et al*., 2001). Außerdem ist die T-Zell-abhängige, humorale Immunantwort ebenfalls VCAM-1 abhängig (Leuker *et al*., 2001).

Neben der verminderten Antikörperproduktion war die Frequenz *T.gondii*-spezifischer, IFN-γ produzierender T-Zellen in der Milz und im Gehirn in *T.gondii*-infizierten, VCAM-1-defizienten Mäusen erheblich reduziert. Vermutlich ist dies auf die fehlende kostimulierende

Aktivität von VCAM-1 durch follikuläre dendritische Zellen in der Milz VCAM-1-defizienter Mäuse zurückzuführen. Ist die Anzahl *T.gondii*-spezifischer T-Zellen in der Milz reduziert, ist auch im Gehirn eine solche Reduktion zu erwarten, da periphere T-Zellen während der akuten Phase der TE in das Gehirn rekrutiert werden und dort nicht weiter proliferieren (Schlüter *et al*., 2002). Neben der Frequenz *T.gondii*-spezifischer T-Zellen war auch die Expression von LFA-1 und CD44, die für aktivierte T-Zellen charakteristisch ist, auf intrazerebralen T-Zellen in VCAM-1-defizienten Mäusen verringert. CD62L, dass auf naiven T-Zellen exprimiert wird, wurde von intrazerebralen T-Zellen VCAM-1defizienter Mäuse und WT-Tiere nicht gebildet. Obwohl intrazerebrale T-Zellen nicht naiv waren, resultierte die VCAM-1-Defizienz in der Rekrutierung schwächer aktivierter T-Zellen in das Gehirn. Vermutlich trägt die reduzierte Frequenz IFN-γ produzierender T-Zellen und der schwach aktivierte Phänotyp $CD8^+$ T-Zellen zur verminderten Resistenz *T.gondii*-infizierter, VCAM-1-defizienter Mäuse bei. IFN-γ, welches von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen produziert wird, ist für die Kontrolle des Erregers von entscheidender Bedeutung, wie eine Vielzahl von Studien belegt (Gazzinelli *et al*., 1992, Schlüter *et al*., 1991, Schlüter *et al*., 1993, Suzuki & Remington, 1988).

Da eine wesentliche Funktion von IFN-γ darin besteht Makrophagen und Mikroglia während der TE zu aktivieren, wurden diese Zellen ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen. Zudem ist die generalisierte Aktivierung der Mikroglia und zerebraler Makrophagen ein Charakteristikum der TE (Schlüter *et al*., 1991). Sie geht mit einer kombinierten Induktion verschiedener Oberflächenmoleküle, einschließlich MHC Kl. I und II sowie LFA-1 und ICAM-1, einher (Deckert-Schlüter *et al*., 1994). Die Aktivierung der Mikroglia und intrazerebraler Makrophagen wurde daher über die MHC Kl. I und II-Expression bestimmt, die in *T.gondii*-infizierten VCAM-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen reduziert war. Da MHC Kl. I und II den Zellen potentiell ermöglichen mit $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu interagieren, ist es denkbar, dass eine gestörte Interaktion zwischen Mikroglia/Makrophagen und T-Zellen zum letalen Verlauf der TE in VCAM-1-defizienten Mäusen beiträgt.

Entgegen der Erwartung war die Rekrutierung von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten in *T.gondii*-infizierte Organe, einschließlich des Gehirns, bei abwesender VCAM-1 Expression der Endothelzellen nicht beeinträchtigt. Außerdem exprimierten VCAM-1-defiziente Mäuse und WT-Tiere den VCAM-1 Liganden CD49d/CD29 (VLA-4) auf intrazerebralen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. CD49d/Integrin β7, ein weiterer VCAM-1 Ligand, wurde in beiden Gruppen von 10% der $CD4^+$ und 22% der $CD8^+$ T-Zellen gebildet. Fehlendes VCAM-1 reduzierte somit nicht die Expression seiner Liganden. Wie histologische

Untersuchungen ergaben, wurde VCAM-1 im Gehirn von konditionalen VCAM-1-defizienten Mäusen nicht vollständig ausgeschaltet. Im Gegensatz zu den Endothelzellen zerebraler Blutgefäße, die vor und nach einer *T.gondii*-Infektion kein VCAM-1 exprimierten, wurde VCAM-1 auf dem Epithel des Plexus choroideus und dem Ependym der Gehirnkammern in VCAM-1-defizienten Mäusen konstitutiv exprimiert. Daher könnten diese Strukturen eine alternative Eintrittspforte der Leukozyten in das Gehirn darstellen. Maligne Lymphomzellen beispielsweise können u.a. über den Plexus choroideus, welcher keine Blut-Hirn-Schranke besitzt, in das Gehirn einwandern (Hochman *et al*., 2001, Assaf *et al*., 1997). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit histologisch keine Akkumulation von Leukozyten im Plexus choroideus oder am Ependym in *T.gondii*-infizierten VCAM-1-defizienten Mäusen und WT-Tieren nachgewiesen werden. Vielmehr waren intrazerebrale Leukozyten entlang der zerebralen Blutgefäße lokalisiert, was für eine Rekrutierung der Leukozyten über das Endothel zerebraler Blutgefäße spricht.

Die Rekrutierung der Leukozyten war neben dem Gehirn auch in anderen Organen von VCAM-1-defizienten Mäusen nicht beeinträchtig. Daher kompensieren vermutlich andere Zelladhäsionsmoleküle einschließlich ICAM-1, welches in *T.gondii*-infizierten Organen verstärkt exprimiert wird, den Verlust des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1. Außerdem waren alle intrazerebralen T-Zellen für LFA-1, einem Liganden von ICAM-1, positiv. Während die Rekrutierung peripherer T-Zellen in das *T.gondii*-infizierte Gehirn VCAM-1-unabhängig ist, durchqueren periphere T-Zellen bei der Experimentellen Autoimmunenzaphalomyelitis (EAE) VCAM-1-abhängig das zerebrale Gefäßendothel, um in das Gehirn einzuwandern. Die EAE ist eine Autoimmunerkrankung des ZNS. Sie wird durch autoreaktive $CD4^+$ T-Zellen verursacht. Die Rekrutierung in das Gehirn wird durch α4-Integrin- sowie VCAM-1-spezifische Antikörper, die eine Interaktion von VCAM-1 der Endothelzellen und seinen T-Zell-Liganden unterbinden, verhindert. (Baron *et al*., 1993, Yednock *et al*., 1992). Möglicherweise wird durch die Erkrankung der Mechanismus und Weg der Leukozyteninfiltration bestimmt. Des Weiteren spielt vermutlich auch der Entwicklungsstatus der Lymphozyten für die Rekrutierung eine Rolle, da VCAM-1 die Rekrutierung unreifer $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie B-Zellen in das Knochenmark vermittelt (Koni *et al*., 2001). Die Daten der verschiedenen Modelle machen deutlich, dass Zelladhäsionsmoleküle sowohl eine überlappende als auch redundante Rolle bei der Regulierung der Rekrutierung ausüben.

Zusammenfassend ergeben die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass in der Abwesenheit von VCAM-1, *T.gondii*-infizierte Mäuse nicht in der Lage sind, intrazerebrale Toxoplasmen zu kontrollieren und schließlich an einer nekrotisierenden TE versterben.

Während VCAM-1 für die Rekrutierung der Leukozyten in das *T.gondii*-infizierte Gehirn keine Rolle spielt, ist das Zelladhäsionsmolekül für die Induktion einer protektiven B- und T-Zellantwort sowie für eine effiziente Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia notwendig.

4.2 Funktionelle Bedeutung von CD4$^+$ T-Zellen für die Induktion einer T.gondii-*spezifischen Immunantwort*

Die vorliegende Arbeit beschäftige sich auch mit der Rolle der CD4$^+$ T-Zellen bei der Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort in *T.gondii*-resistente Mäusen. Es wurde überprüft, ob durch das Fehlen CD4$^+$ T-Zellen in *T.gondii*-resistenten Mäusen die Induktion einer *T.gondii*-spezifischen CD8$^+$ T-Zellantwort sowie B-Zellantwort und Makrophagen und Mikrogliaaktivierung beeinträchtigt ist. Für die Untersuchungen wurden CD4$^+$ T-Zellen mit Hilfe von anti-CD4-Antikörpern in der Maus eleminiert (Depletion).

Obwohl vorangegangene Studien nahe legen, dass CD4$^+$ T-Zellen für die Vermittlung einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort von entscheidender Bedeutung sind, wurde nicht geklärt, wie CD4$^+$ T-Zellen zur Resistenz gegen *T.gondii* beitragen (Gazzinelli *et al*., 1992, Gazzinelli *et al*., 1991, Israelski *et al*., 1989, Vollmer *et al*., 1987) oder es wurden nur Teilaspekte, ausschließlich in *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen, analysiert (Casciotti *et al*., 2002, Johnson & Sayles, 2002, Denkers *et al*., 1996). Im Gegensatz zu *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen, die eine letale, progressive TE entwickeln, ähnelt die murine Toxoplasmose *T.gondii*-resistenter Mäuse in ihrem Krankheitsverlauf der humanen Toxoplasmose (Schlüter *et al*, 1991). Außerdem lassen sich *T.gondii*-resistente Mäuse oral, also über den natürlichen Weg der Infektion, infizieren.

Fehlen CD4$^+$ T-Zellen aufgrund einer CD4-Depletion, waren *T.gondii*-resistente CB6-Mäuse erheblich in ihrer Resistenz beeinträchtigt und der Großteil verstarb bis zum Tag 28 nach einer *T.gondii*-Infektion an einer nekrotisierenden TE. Insbesondere die B-Zellantwort war in CD4-depletierten Mäusen im Vergleich zu nicht-depletierten Tieren stark eingeschränkt. Während im Serum CD4-depletierter CB6-Mäuse *T.gondii*-spezifische IgG, IgM und IgA Antikörper reduziert waren, führte die Depletion CD4$^+$ T-Zellen im ZNS zum kompletten Verlust *T.gondii*-spezifischer Antikörper. Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine Funktion CD4$^+$ T-Zellen darin besteht, eine *T.gondii*-spezifische Antikörperantwort zu induzieren. Wie auch in VCAM-1 defizienten Mäusen trägt wahrscheinlich die reduzierte B-Zellantwort in

CD4-depletierten, *T.gondii*-resistenten Mäusen zum Tod der Tiere bei. Obwohl *T.gondii* ein obligat intrazellulärer Parasit ist, tragen B-Zellen über die Produktion von *T.gondii*-spezifischen Antikörpern wesentlich zum Schutz bei. So sind B-Zell-defiziente Mäuse aufgrund einer reduzierten Produktion *T.gondii*-spezifischer Antikörper in ihrer Resistenz gegen *T.gondii* eingeschränkt und versterben schon früh an einer TE (Kang *et al*., 2000, Sayles *et al*., 2000). *T.gondii* vermehrt sich als intrazellulärer Parasit innerhalb der Wirtszelle. Die Verbreitung des Parasiten und die Infektion weiterer Wirtszellen findet aber extrazellulär, durch invasive Tachyzoiten, statt. Wie *T.gondii*-spezifische Antikörper einen Schutz vermitteln ist noch unklar. Vermutlich verhindern sie die Infektion der Wirtszelle durch Tachyzoiten oder vermitteln eine effektive Fc-Rezeptor-abhängige Eliminierung Antikörper-opsonierter Parasiten durch aktivierte, phagozytierende Makrophagen (Sayles *et al*., 2000, Anderson *et al*., 1976). Es ist aber auch denkbar, dass freie Tachyzoiten über den klassischen Weg der Komplementkaskade Antikörper-abhängig lysiert werden (Suzuki & Kobayashi, 1985, Schreiber & Feldman, 1980).

Neben *T.gondii*-resistenten Mäusen wurde die Rolle der $CD4^+$ T-Zellen bei der Induktion einer Immunantwort in *T.gondii*-suszeptiblen, MHC Kl. II defizienten, denen konventionelle $CD4^+$ T-Zellen fehlen, und CD4-depletierten, C57BL/6 (WT) Mäusen analysiert. Es konnte so überprüft werden, ob sich diese zwei Mausmodelle (resistent/suszeptibel) in der Induktion einer *T.gonii*-spezifischen Immunantwort unterscheiden. Die Verwendung von MHC Kl. II defizienten Mäusen ermöglichte außerdem, die funktionelle Bedeutung von nicht-konventionellen $CD4^+$ T-Zellen bei der Toxoplasmose zu untersuchen.

Sowohl *T.gondii*-suszeptible, MHC Kl. II-defiziente Mäuse, CD4-depletierte, MHC Kl. II-defiziente Mäuse und CD4-depletierte, *T.gondii*-suszeptible WT-Tiere verstarben bis zum Tag 45 nach Infektion an einer TE aufgrund einer unzureichenden zerebralen Erregerkontrolle. Ähnlich wie in *T.gondii*-resistenten Mäusen war die Bildung einer spezifischen Antikörperantwort in *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen erheblich reduziert. Die Reduktion der Antikörper in MHC Kl. II-defizienten Mäusen und CD4-depletierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen war zwischen beiden Gruppen vergleichbar. Damit führte die zusätzliche Depletion nicht-konventioneller $CD4^+$ T-Zellen in MHC Kl. II-defizienten Mäusen zu keiner weiteren Reduktion *T.gondii*-spezifischer IgG-Antikörper und verminderte nur geringfügig die Bildung *T.gondii*-spezifischer IgM-Antikörper. Es ist daher wahrscheinlich, dass nicht-konventionelle, MHC Kl. II-unabhängige $CD4^+$ T-Zellen nicht über die Aktivierung von B-Zellen zur Antikörperproduktion in MHC Kl. II-defizienten Mäusen beitragen.

Um zu überprüfen, ob spezifische Antikörper in *T.gondii*-resistenten und -suszeptiblen Mäusen einen Schutz gegen den intrazellulären Parasiten vermitteln und die Resistenz der Tiere verbessert, wurden die Mäuse mit Immunserum, welches *T.gondii*-spezifische Antikörper enthält, behandelt. In infizierten CD4-depletierten, *T.gondii*-resistenten Mäusen vermittelte die Behandlung mit diesem Immunserum einen partiellen Schutz und 50% der Tiere überlebten die Infektion bis zum Versuchsende. Auch in infizierten MHC Kl. II-defizienten Mäusen wirkten *T.gondii*-spezifische Antikörper protektiv. Im Gegensatz zu CD4-depletierten, *T.gondii*-resistenten Mäusen konnte die Behandlung aber nur einen temporären Schutz vermitteln und das Überleben der Tiere verlängern. Diese Daten stimmen mit Experimenten an CD4-defizienten, *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen, die keine $CD4^+$ T-Zellen besitzen, überein. So sind *T.gondii*-infizierte, CD4-defiziente Mäuse in ihrer Resistenz gegen *T.gondii* aufgrund einer unzureichenden Antikörperantwort erheblich eingeschränkt und versterben im Vergleich zu WT-Tieren schon früh an einer TE (Johnson & Sayles, 2001). Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit für MHC Kl. II-defiziente Mäuse beschrieben, zeigen Johnson und Sayles 2001, dass *T.gondii*-spezifisches Immunserum in CD4-defizienten, *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen das Überleben dieser Mäuse verlängert. Werden CD4-defiziente, *T.gondii*-suszeptible Mäuse dagegen mit temperatur-sensitiven (Ts)-4 Toxoplasmen immunisiert und anschließend mit virulenten RH-Tachyzoiten infiziert, versterben sie erst nach Beendigung der Behandlung (Johnson & Sayles, 2001).

Ob $CD4^+$ T-Zellen für die Induktion einer primären $CD8^+$ T-Zellantwort notwendig sind, wird kontrovers diskutiert (Moretto *et al*., 2000, Ridge *et al*., 1998, Bennett *et al*., 1997, von Herrath *et al*., 1996, Gazzinelli *et al*., 1991, Jennings *et al*., 1991, Rahemtulla *et al*., 1991, Leist *et al*., 1989, Ahmed *et al*., 1988, Buller *et al*., 1987). Auch bei einer *T.gondii*-Infektion ist die Bedeutung der $CD4^+$ T-Zellen bei der Induktion einer spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort noch weitgehend unklar (Casciotti *et al*., 2002, Denkers *et al*., 1996, Denkers *et al*., 1993). Obwohl $CD8^+$ T-Zellen wesentlich zur Wachstumskontrolle von *T.gondii* beitragen, sind bisher keine MHC Kl. I-abhängigen, immundominanten $CD8^+$ T-Zellepitope bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher β-Galaktosidase, welches u.a. das H-$2L^d$-abhängige β-$gal_{876-884}$ CD8 T-Zellepitop enthält, als Modellantigen in β-Galaktosidase-transfizierten Toxoplasmen (Kwok *et al*., 2003) verwendet. Im Gegensatz zu vorangegangen Untersuchungen (Casciotti *et al*., 2002, Denkers *et al*., 1996, Denkers *et al*., 1993) war es daher möglich, durch den Einsatz des Modellantigens β-Galaktosidase die Induktion $CD8^+$ T-Zellen auf Peptid-spezifischer Ebene phänotypisch und funktionell zu charakterisieren. Zusätzlich wurde die MHC-Tetramertechnik (Altman *et al*., 1996) verwendet, die eine direkte

ex vivo Detektion Antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen ohne eine vorherige *in vitro* Expansion ermöglicht.

Die Frequenz β-$gal_{876-884}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen von *T.gondii*-infizierten, CD4-depletierten CB6-Mäusen, die mit Hilfe der MHC Kl. I-Tetramertechnik bestimmt wurde, unterschied sich nicht von der Frequenz $CD8^+$ T-Zellen von nicht-depletierteren Tieren. Außerdem exprimierten β-$gal_{876-884}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen beider Gruppen CD44 und nur geringfügig CD62L, wie dies für aktivierte $CD8^+$ T-Zellen typisch ist.

$CD8^+$ T-Zellen wirken im Wesentlichen über die Produktion des Zytokins IFN-γ sowie TNF-α protektiv und tragen insbesondere während der chronischen Phase über ihre Zytotoxizität zur Erregerkontrolle bei (Denkers *et al*., 1997, Gazzinelli *et al*., 1992, Gazzinelli *et al*., 1991, Suzuki & Remington, 1988). Daher wurden neben der phänotypischen Analyse Peptid-spezifische $CD8^+$ T-Zellen auch funktionell untersucht und die IFN-γ und TNF-α Produktion sowie die zytotoxische Aktivität spezifischer $CD8^+$ T-Zellen bestimmt. In der Milz war die Produktion von IFN-γ und TNF-α β-$gal_{876-884}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen CD4-depletierter Tiere nicht beeinträchtigt. Obwohl im Gehirn eine Reduktion beider Zytokine ermittelt wurde, führte die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen nicht zum vollständigen Verlust der IFN-γ und TNF-α Produktion. β-$gal_{876-884}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen von CD4-depletierten Mäusen waren trotzdem in der Lage IFN-γ und TNF-α zu bilden. Außerdem waren intrazerebrale, β-$gal_{876-884}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen beider Gruppen zytotoxisch aktiv. Die zytotoxische Aktivität β-$gal_{876-884}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen aus CD4-depletierten Mäusen waren dabei im Vergleich zu den nicht-depletierten Kontrolltieren leicht vermindert.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass $CD4^+$ T-Zellen bei der Induktion einer CD8-vermittelten *T.gondii*-spezifischen Immunantwort in *T.gondii*-resistenten CB6-Mäusen nicht wesentlich beteiligt sind. β-$gal_{876-884}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen wiesen keinen Unterschied in der Frequenz auf und waren nur partiell in ihrer Funktion geschwächt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu vorangegangenen Untersuchungen an *T.gondii*-suszeptiblen, CD4-defizienten Mäusen, die nach *T.gondii*-Infektion keine Beeinträchtigung bei der Induktion einer $CD8^+$ T-Zellantwort aufweisen (Casciotti *et al*., 2002, Johnson & Sayles, 2001). Wie auch in *T.gondii*-suszeptiblen CD4-defizienten Mäusen (Casciotti *et al*., 2002, Johnson & Sayles, 2001) war die IFN-γ Produktion der $CD8^+$ T-Zellen in infizierten *T.gondii*-suszeptiblen, MHC Kl. II-defizienten Mäuse nicht reduziert. Auch vorangegangene Untersuchungen ts-4-immunisierter, MHC Kl. II-defizienter Mäuse bestätigen, dass $CD8^+$ T-

Zellen in MHC Kl. II-defizienten Mäusen in ihrer IFN-γ Produktion und Zytotoxizität nicht beeinträchtigt sind (Denkers *et al*., 1996).

Obwohl MHC Kl. II-defiziente Mäuse keine MHC Kl. II-Moleküle exprimieren, besitzen sie eine kleine Population MHC Kl. II-unabhängiger $CD4^+$ T-Zellen, die teilweise auch NK1.1-positiv sind. Wahrscheinlich werden diese nicht-konventionellen $CD4^+$ T-Zellen während der Differenzierung im Thymus durch das β2-Mikroglobulin-assozierte MHC Kl. I-ähnliche Molekül CD1 selektioniert (Bendelac *et al*., 1995, Bendelac *et al*., 1994, Cardell *et al*., 1995). Als antigenpräsentierendes Molekül kann CD1 nicht nur Glykolipide sondern auch Peptide binden und den T-Zellen präsentieren (Tangri *et al*., 1998, Beckman *et al*., 1994). Nicht-konventionelle $CD4^+$ T-Zellen können *in vitro* IL-2, IL-4 und IFN-γ nach Stimulation mit CD1 und/oder anti-CD3 bilden (Chen & Paul, 1998, Chen & Paul, 1997, Cardell *et al*., 1995, Yoshimoto & Paul, 1994, Hayakawa *et al*., 1992). Die Funktion dieser Zellen *in vivo* ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass nicht-konventionelle $CD4^+$ T-Zellen *T.gondii*-infizierter, MHC Kl. II-defizienter Mäuse sowohl CD1 als auch *Toxoplasma*-Antigen für eine effektive IFN-γ-Produktion benötigen. Obwohl nicht-konventionelle $CD4^+$ T-Zellen funktionell aktiv waren, scheinen sie nicht wesentlich an der Protektion gegen *T.gondii* beteiligt zu sein, da die CD4-Depletion MHC Kl. II-defizienter Mäuse weder das Überleben, noch die IFN-γ-Produktion der $CD8^+$-T-Zellen beeinträchtigte. Im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen wiesen Denkers *et al*., 1996 nach, dass nicht nur die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen sondern auch von IL-2 und NK1.1 in ts-4-immunisierten, MHC Kl. II-defizienten Mäusen sich reduzierend auf die IFN-γ Produktion der $CD8^+$ T-Zellen auswirkt. Sie schlussfolgern daher, dass eine kleine Population nicht-konventioneller $CD4^+$NK1.1 T-Zellen während der ts4-Immunisierung über die Bildung von IL-2 zur Generierung von $CD8^+$ Effektorzellen in MHC Kl. II-defizienten Mäusen beiträgt. Interessanterweise beeinflusste die Depletion von IL-2 die Generierung von $CD8^+$ T-Zellen in WT-Tieren nicht (Denkers *et al*., 1996).

Unterschiede in den Untersuchungsergebnissen lassen sich durch die Verwendung verschiedener *Toxoplasma*-Stämme erklären. So wurden für die Untersuchungen mutante Toxoplasmen (ts-4) zur Immunisierung eingesetzt und die Mäuse dann mit stark-virulenten RH-Tachyzoiten subkutan infiziert (Denkers *et al*., 1996). In dieser Arbeit hingegen wurden für die Infektion von MHC Kl. II-defizienten Mäusen Zysten des schwach-virulenten *Toxoplasma*-Stamms ME49 verwendet, die oral, über den natürlichen Weg der Infektion, appliziert wurden. Außerdem wurde die gesamte Population nicht-konventioneller $CD4^+$ T-

Zellen analysiert, während sich die Analysen von Denkers *et al*, 1996 auf die Subpopulation $CD4^+NK1.1^+$ T-Zellen beschränkten.

$CD8^+$ T-Zellen können auch in der Abwesenheit von IL-2 produzierenden $CD4^+$ T-Zellen zu Effektorzellen differenzieren (Moretto *et al*., 2000, Ridge *et al*., 1998, Rahemtulla *et al*., 1991, Buller *et al*., 1987). So induziert beispielweise das intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogeneses* ohne die Hilfe von $CD4^+$ T-Zellen eine primäre, spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort (Lauvau *et al*., 2001, Ladel *et al*., 1994, Rahemtulla *et al*., 1991). Für den Parasiten *Plasmodium yoelii* wurde gezeigt, dass die Generierung einer frühen $CD8^+$ T-Zellantwort von IL-12 und NK-Zellen abhängig ist (Doolan & Hoffman, 1999). Eine starke Induktion IL-12-abhängiger NK-Zellen während der akuten Phase einer *Toxoplasma*-Infektion wurde bereits beschrieben (Khan *et al*., 1994, Gazzinelli *et al*., 1991) Es ist daher denkbar, dass eine frühe $CD8^+$ T-Zellantwort gegen *T.gondii* durch IFN-γ-produzierende NK-Zellen reguliert wird. Möglicherweise können auch alternative Zytokine wie IL-15, dessen Bildung durch *T.gondii* induziert wird und das in seiner Funktion IL-2 ähnelt, zur Induktion einer primären $CD8^+$ T-Zellantwort beitragen (Doherty *et al*., 1996, Khan & Kasper, 1996). Auch für IL-7 ist beschrieben, dass es sowohl die Proliferation von $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen induziert als auch stimulierend auf die IFN-γ Produktion und zytotoxische Aktivität von $CD8^+$ T-Zellen wirkt (Kasper *et al*., 1995, Grabstein *et al*., 1990).

Aktuelle Untersuchungen deuten daraufhin, dass $CD4^+$ T-Zellen bei der Generierung funktionaler $CD8^+$ Gedächtniszellen eine wesentliche Rolle spielen (Sun & Bevan, 2003, Shedlock & Shen, 2003, Janssen *et al*., 2003). Auch in *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen sind $CD4^+$ T-Zellen möglicherweise für die Aufrechterhaltung einer $CD8^+$ T-Zellantwort gegen eine *T.gondii*-Infektion nötig (Casciotti *et al*., 2002). Ob dies auch für *T.gondii*-resistente Mäuse zutrifft, ist bisher nicht bekannt und wird zur Zeit in laufenden Untersuchungen überprüft.

Neben der phänotypischen und funktionellen Analyse von $CD8^+$ T-Zellen und B-Zellen wurde außerdem untersucht, ob die Induktion der Makrophagen und Mikroglia in *T.gondii*-infizierten, CD4-depletierten Mäusen beeinträchtigt ist und sie dadurch zur verminderten Resistenz beitragen. Wie vorangegangene Studien belegen, ist die *de novo* Expression von MHC Kl. II sowie eine verstärkte TNF-α-Produktion für aktivierte Mikroglia bei der TE charakteristisch. Auch aktivierte Makrophagen zeigen eine erhöhte Expression von MHC Kl. II und eine verstärkte TNF-α Produktion nach einer *T.gondii*-Infektion (Schlüter *et al*., 2001, Deckert-Schlüter *et al*., 1994). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Induktion zerebraler Makrophagen und Mikroglia über die MHC Kl. II Expression und die TNF-α

Produktion in CD4-depletierten Mäusen und nicht-depletierten Tieren bestimmt. Beide Gruppen zeigten eine vergleichbare, starke Expression von MHC Kl. II auf zerebralen Makrophagen und Mikroglia nach einer *T.gondii*-Infektion. Die TNF-α Produktion zerebraler Makrophagen und Mikroglia war in infizierten CD4-depletierten Mäusen nicht beeinträchtigt. Die Daten deuten darauf hin, dass Mikroglia und Makrophagen aktiviert sind und die verminderte Resistenz in CD4-depletiereten Mäusen nicht auf eine unzureichende Aktivierung dieser Zellen beruht.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass in *T.gondii*-resistenten und suszeptiblen Mäusen insbesondere die B-Zellantwort erheblich reduziert ist und eine wesentliche Funktion der $CD4^+$ T-Zellen darin besteht, eine *T.gondii*-spezifische Antikörperantwort zu induzieren. *T.gondii*-spezifische Antikörper alleine vermitteln aber keinen ausreichenden Schutz. In CD4-depletierten, *T.gondii*-resistenten Mäusen trägt möglicherweise die reduzierte IFN-γ und TNF-α Produktion intrazerebraler $CD8^+$ T-Zellen zur eingeschränkten Resistenz bei. Da konventionelle $CD4^+$ T-Zellen aber auch über die Produktion von IFN-γ einen Schutz gegen *T.gondii* vermitteln, könnte auch das Fehlen IFN-γ produzierender $CD4^+$ T-Zellen selbst für die eingeschränkte Resistenz in *T.gondii*-resistenten Mäusen mit verantwortlich sein.

Obwohl nicht-konventionelle *T.gondii*-spezifische $CD4^+$ T–Zellen CD1-abhängig IFN-γ produzieren, können sie die Funktion fehlender konventioneller $CD4^+$ T-Zellen in MHC Kl. II-defizienten Mäusen nicht kompensieren. Vermutlich trägt auch in *T.gondii*-suszeptiblen MHC Kl. II-defizienten Mäusen die fehlende IFN-γ Produktion $CD4^+$ T-Zellen zur unzureichenden Erregerkontrolle und frühen Tod der Tiere bei.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) bei der Toxoplasmose, und damit erstmals bei einer murinen Infektionskrankheit, analysiert. Dazu wurden $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse verwendet, in denen das VCAM-1-Gen durch eine IFN-α induzierbare Cre *loxP*-abhängige Deletion neonatal ausgeschaltet war. Dies führte zu einer fehlenden Induktion von VCAM-1 auf den Endothelzellen zerebraler Blutgefäße. Die konstitutive Expression von VCAM-1 auf dem Epithelzellen des Plexus choroideus und dem Ependym der Gehirnkammern war dagegen nicht betroffen. Die Resistenz gegen *T.gondii* in $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäusen war stark beeinträchtigt. So verstarben VCAM-1-defiziente Mäuse an einer chronischen TE aufgrund einer unzureichenden, zerebralen Erregerkontrolle. Entgegen der Erwartung war die Rekrutierung der Leukozyten unverändert. Dagegen zeigten $VCAM^{flox/flox\ MxCre}$ Mäuse eine Reduktion in der Produktion *T.gondii*-spezifischer Antikörper sowie in der Frequenz und im Aktivierungsstatus intrazerebraler, *T.gondii*-spezifischer T-Zellen. Auch die Makrophagen- und Mikrogliaaktivierung war deutlich verringert.

In dieser Arbeit wurde außerdem die Rolle der $CD4^+$ T-Zellen bei der Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Immunantwort in CD4-depletierten, *T.gondii*-resistenten Mäusen, die keine $CD4^+$ T-Zellen besitzen, untersucht. Als Vergleich dienten nicht-depletierte Kontrolltiere. Wurden CD4-depletierte Mäuse mit β-Galaktosidase-exprimierenden Toxoplasmen infiziert, entwickelten sie eine nekrotisierende TE und verstarben bis zum Tag 28 nach Infektion, während nicht-depletierte Tiere überlebten. Die Frequenz und der Aktivierungsstatus β-Galaktosidase-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen war in CD4-depletierten, *T.gondii*-resistenten Mäusen nicht beeinträchtigt. Antigen-spezifische $CD8^+$ T-Zellen der Milz und des Gehirns aus CD4-depletierten Tieren produzierten außerdem IFN-γ und TNF-α und waren zytotoxisch aktiv. Diese Funktionen der $CD8^+$ T-Zellen waren in depletierten Mäusen im Gehirn jedoch geringfügig reduziert. Die Aktivierung zerebraler Makrophagen und Mikroglia, die durch die MHC Kl. II-Expression und TNF-α Produktion ermittelt wurde, war in CD4-depletierten Mäusen nicht vermindert. Dagegen war die Produktion *T.gondii*-spezifischer Antikörper im Serum CD4-depletierter Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe stark reduziert. Im Liquor führte die CD4-Depletion zum völligen Verlust *T.gondii*-spezifischer IgG und IgM Antikörper. Die Behandlung mit *T.gondii*-antikörperhaltigem Immunserum konnte die Resistenz CD4-depletierter Mäuse gegen *T.gondii* verbessern und die Überlebensrate deutlich erhöhen.

Die funktionelle Bedeutung von $CD4^+$ T-Zellen für die Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Antikörperantwort wurde auch in *T.gondii*-suszeptiblen, MHC Kl. II-defizienten Mäusen, denen konventionelle $CD4^+$ T-Zellen fehlen, sowie in *T.gondii*-suszeptiblen, CD4-depletierten Mäusen nachgewiesen. Ähnlich wie in *T.gondii*-resistenten Mäusen, wiesen infizierte *T.gondii*-suszeptible Mäuse eine erheblich Reduktion der *T.gondii*-spezifischen Antikörper auf. Durch die Behandlung mit *T.gondii*-spezifischen Antikörpern von MHC Kl. II-defizienten Mäusen konnte die eingeschränkte Resistenz temporär überwunden werden. Im Gegensatz zur B-Zellantwort war die Induktion einer $CD8^+$ T-Zellantwort in *T.gondii*-suszeptiblen Mäusen von $CD4^+$ T-Zellen unabhängig. Die Untersuchung von nicht-konventionellen, *T.gondii*-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen aus MHC Kl. II-defizienten Mäusen ergab, dass diese trotz der CD1-abhängigen IFN-γ Produktion, nicht zum Schutz gegen *T.gondii* beitragen. Außerdem war sowohl die Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Antikörperantwort als auch die Induktion einer *T.gondii*-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort von nicht-konventionellen $CD4^+$ T-Zellen unabhängig.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass VCAM-1 und $CD4^+$ T-Zellen für die Kontrolle des intrazellulären Parasiten *T.gondii* von entscheidender Bedeutung sind. Während VCAM-1 sowohl für die Induktion einer *T.gondii*-spezifischen Antikörperantwort als auch für eine effektive T-Zellantwort und Makrophagen/Mikrogliaaktivierung verantwortlich ist, können andere Zelladhäsionsmoleküle die VCAM-1-abhängige Rekrutierung über die zerebralen Blutgefäße effektiv kompensieren. Auch die Funktion von $CD4^+$ T-Zellen besteht darin eine *T.gondii*-spezifische Antikörperantwort zu induzieren. Im Gegensatz zu VCAM-1 sind $CD4^+$ T-Zellen an der Induktion einer *T.gondii*-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort nur unwesentlich beteiligt und spielen keine Rolle bei der Makrophagen- und Mikrogliaaktivierung.

6. Glossar

Antigenpräsentation beschreibt das Vorzeigen von Antigenen wie Peptiden, die an MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche gebunden sind. T-Zellen, die MHC-restringiert sind, erkennen Antigene nur in dieser Form.

Antigenpräsentierende Zellen (APZ) präsentieren Antigene auf ihrer Zelloberfläche, die an MHC Kl. I oder II gebunden sind. Neben ihrer Fähigkeit Antigene zu präsentieren, zeichnen sie sich durch ihre kostimulierende Aktivität aus, die für die Aktivierung von Lymphozyten essentiell ist. Dendritische Zellen, →Makrophagen und →B-Zellen sind wichtige APZ für T-Zellen. Dagegen spielen follikuläre dendritische Zellen bei der Antigenpräsentation für B-Zellen eine zentrale Rolle.

B-Zellen werden durch den Kontakt mit Antigen aktiviert und differenzieren zu Antikörper-produzierenden Zellen. Die Antikörper sind dabei für das Antigen spezifisch. B-Zellen benötigen für ihre Aktivierung die Hilfe von →$CD4^+$ T-Zellen. Sie können aber auch T-Zell-unabhängig Antikörper produzieren.

Für die Reifung ***$CD4^+$ T-Zellen*** im Thymus ist gewöhnlich MHC Kl. II notwendig. Die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu $CD4^+$ T-Effektorzellen wird von →antigenpräsentierenden Zellen induziert. $CD4^+$ T-Zellen erkennen dabei MHC Kl. II-abhängig Peptide, die von den antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden. Daneben ist für die Differenzierung und Proliferation die kostimulierende Aktivität antigenpräsentierender Zellen sowie → IL-2 essentiell. $CD4^+$ T-Zellen werden gewöhnlich in TH1 und TH2-Zellen unterteilt. TH1-Zellen produzieren Zytokine wie z.B. →IL-2, →IFN-γ →TNF-α und sind in der Lage Makrophagen zu aktivieren. TH-2-Zellen zeichnen sich dagegen durch die Synthese von IL-4, IL-5 und IL-10 aus und sind für die B-Zellaktivierung von Bedeutung. Häufig besteht aber keine strikte Trennung dieser zwei Subpopulationen, sondern es sind vielmehr fließende Übergänge möglich. $CD4^+$ T-Zellen können außerdem die Proliferation und Differenzierung von $CD8^+$ T-Zellen z.B. über die Produktion von IL-2 unterstützen. Außerdem können beispielsweise humane $CD4^+$ T-Zellen zytotoxisch aktiv (→Zytotoxizität) sein.

$CD8^+$ T-Zellen reifen im Thymus MHC Kl. I-abhängig. Für die Differenzierung und Proliferation müssen sie über den T-Zellrezeptor mit dem Peptid-MHC-Kl. I-Komplex einer →antigenpräsentierenden Zelle interagieren. Die kostimulierende Aktivität der APZ sowie →IL-2 ist ebenfalls essentiell. Einige $CD8^+$ T-Zellen benötigen für die Differenzierung die Hilfe →$CD4^+$ T-Zellen. $CD8^+$ T-Effektorzellen sind zytotoxisch aktiv (→Zytotoxizität) und produzieren neben verschiedenen anderen Zytokinen insbesondere →IFN-γ sowie →TNF-α.

In dieser Arbeit beschreibt die ***Depletion*** die Eliminierung von $CD4^+$ T-Zellen in der Maus durch die Applikation von anti-CD4-Antikörpern. $CD4^+$ T-Zellen werden dabei über die antikörperabhängige →Komplementkaskade lysiert. Damit besitzen CD4-depletierte Mäuse keine $CD4^+$ T-Zellen.

Die Hauptproduzenten von ***Interferon (IFN)-γ*** sind →$CD8^+$ und →$CD4^+$ T-Zellen sowie NK-Zellen. IFN-γ aktiviert →Makrophagen, die u.a. verstärkt MHC Kl. I und II bilden und anti-mikrobielle Mechanismen ausüben. Außerdem fördert IFN-γ die Differenzierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie →B-Zellen und unterstützt die IgG2a-Antikörper-Synthese. Daneben wirkt IFN-γ aktivierend auf NK-Zellen sowie somatischen Zellen. IFN-γ kann außerdem die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, einschließlich →VCAM-1, auf den Endothelzellen verstärken. Eine exzessive Produktion von IFN-γ kann aber auch destruktiv wirken und beispielsweise die Apoptose von T-Zellen induzieren.

Interleukin (IL)-2 wird von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen gebildet, nachdem sie von →antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aktiviert worden sind. IL-2 ist für die Proliferation sowie für die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Effektorzellen notwendig. IL-2 wird auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet. Außerdem stimuliert IL-2 das Wachstum von B-Zellen und NK-Zellen.

Das ***Komplementsystem*** setzt sich aus einer Vielzahl von Plasmaproteinen zusammen, die gemeinsam extrazelluläre Krankheitserreger angreifen. Es kann sowohl spontan (alternativer Weg der Komplementkaskade), als auch durch die Bindung von Antikörpern an den Erreger (klassischer Weg der Komplementkaskade) aktiviert werden. Die Hülle aus Komplementproteinen (→Opsonierung), die den Infektionserreger dann umgibt, erleichtert seine Aufnahme durch phagozytierende Zellen wie z.B. →Makrophagen. Auch die Komplementproteine selbst können den Erreger abtöten und durch die Ausbildung eines membranangreifenden Komplexes dessen Lyse herbeiführen.

Der ***Liquor*** ist die Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, die das Nervengewebe vor Erschütterung schützt.

Makrophagen sind phagozytierende Zellen, die als antigenpräsentierende Zellen sowie Effektorzellen fungieren können. Für die Eliminierung intrazellulärer Erreger müssen sie von T-Zellen aktiviert werden. Zu den anti-mikrobiellen Effektormechanismen der Makrophagen zählt die Bildung von toxischen, reaktiven Stickstoffoxiden (NO) und Sauerstoffradikalen sowie der Abbau der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO).

Die ***Mikroglia*** ist die residente Makrophagenpopulation (→Makrophagen) des Gehirns. Sie wandert gegen Ende der Ontogenese oder während der frühen postnatalen Stadien in das Gehirn ein und wird im reifen Gehirn praktisch nicht mehr durch hämatopoetische Zellen ersetzt. Als eine Makrophagenpopulation besitzt die Mikroglia neben der Fähigkeit zur Phagozytose auch anderer typische Makrophageneigenschaften. Aktivierte Mikroglia exprimiert außerdem verschiedene Oberflächenmoleküle, einschließlich MHC Kl. I und II. Im Gegensatz zu den meisten hirneigenen Zellen ist sie daher zur →Antigenpräsentation befähigt.

Nicht-konventionelle $CD4^+$ T-Zellen werden im Gegensatz zu konventionellen $CD4^+$ T-Zellen im Thymus durch das MHC Kl. I-ähnliche Molekül CD1, in MHC Kl. II-defizienten Mäusen, selektioniert. Sie produzieren MHC Kl. II-unabhängig nach CD1 und/oderCD3 Stimulation Zytokine wie z.B. →IL-2, IL-4 und →IFN-γ.

Unter ***Opsonierung*** versteht man die Veränderung der Oberfläche von Krankheitserregern oder anderen Fremdkörpern, so dass sie von phagozytierenden Zellen, einschließlich →Makrophagen, effektiv aufgenommen und eliminiert werden können. Antikörper und das Komplementsystem opsonieren extrazelluläre Erreger und ermöglichen so deren Phagozytose.

Der ***Plexus choroideus*** ist das liquorbildende Adergeflecht der Hirnkammern.

Die Hauptproduzenten von ***Tumornekrosefaktor (TNF)-α*** sind →Makrophagen, → $CD8^+$ und →$CD4^+$ T-Zellen sowie NK-Zellen. TNF-α unterstützt die durch →IFN-γ-vermittelten Funktionen. Außerdem ruft TNF-α lokale Entzündungsreaktionen hervor und fördert wie IFN-γ die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel.

Ein ***T-Zell-Epitop*** ist ein kurzes Peptid aus einem Proteinantigen. Es bindet an ein MHC-Molekül und wird von T-Zellen, die für dieses Peptid-spezifisch sind, über ihren T-Zellrezeptor erkannt.

Das Zelladhäsionsmolekül ***VCAM-1*** (Vascular Cell Adhesion molecule-1) oder CD106 wird von den Endothelzellen der Blutgefäßen exprimiert und vermittelt die Rekrutierung der Leukozyten. Liganden sind VLA-4 (Very Late Antigen-4; CD49d/CD29) sowie CD49d/Integrin β, dass mit geringerer Affinität an VCAM-1 bindet. Für eine effektive Expression ist die Aktivierung der Endothelzellen durch Zytokine wie →IFN-γ und →TNF-α nötig. VCAM-1 wird aber auch von anderen Zellen wie den Stromazellen des Knochenmarks oder follikulären dendritischen Zellen gebildet. Es vermittelt neben der Rekrutierung von Leukozyten eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Immunreaktionen und ist an der der Reifung, Aktivierung und Kostimulierung von Lymphozyten beteiligt.

Die ***Zytotoxizität*** ist die Fähigkeit, infizierte Zielzellen selektiv abzutöten. Durch die Freisetzung von Perforinen die an der Zielmembran der infizierten Zellen Poren ausbilden, und Granenzymen (Proteasen), wird der Zelltod durch Apoptose induziert. Zytotxisch aktive Zellen sind →$CD8^+$ T-Zellen sowie NK-Zellen. Aber auch →$CD4^+$ T-Zellen können zytotoxisch aktiv sein.

7. Abkürzungsverzeichnis

APZ	antigenpräsentierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin
CD	engl. Cluster of Differentiation
ConA	Concanavalin A
cpm	engl. counts per minute
DC	engl. Dendritic Cell (Dendritische Zellen)
DMEM	engl. Dulbeccos Minimal Essential Medium
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. Enzyme-Linked- Immunosorbent-Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ELISPOT	engl. Enzyme-Linked Immunospot
FCS	engl. Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	engl. hour (Stunde)
H-2	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
HBSS	engl. Hanks Balanced Salt Solution
HC	engl. Heavy Chain (Schwere Kette)
HKT	engl. Heat-Killed Toxoplasma (Hitze getötete Toxoplasmen)
ICAM-1	engl. Intercellular Adhesion Molecule-1
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin
iNOS	induzierbare Nitritoxid Synthase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kD	Kilodalton
LB	Luria- Bertani Broth
LCA	engl. Leucocyte Common Antigen

LFA-1	engl. Leucocyte Function-associated Antigen-1
MACS	engl. Magnetic-Antibody-Cell seperation System
MEMα	engl. Minimal Essential Medium α
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MHC Kl. I/II	MHC Klasse I/II
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	engl. Nitrogen Oxid (Stickstoffoxid)
OD	optische Dichte
PBS	engl. phosphate buffer saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
Pen/Strep	Penicillin/Spreptomycin
PE	Phycoerythrin
p.i.	lat. post infectionem (nach Infektion)
rpm	engl. rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
TE	*Toxoplasma*-Enzephalitis
T.gondii	*Toxoplasma gondii*
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
T-Zelle	thymusabhängige Zellen
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
v/v	Volumenanteil
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil
ZNS	Zentralnervensystem

8. Literaturverzeichnis

Adams LB, Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Krahenbuhl JL (1990)
Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine.
J Immunol 144**:** 2725-9.

Ahmed R, Butler LD, Bhatti L (1988)
$T4^+$ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses.
J Virol 62**:** 2102-6.

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996)
Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.
Science 274**:** 94-6.

Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO (1999)
Alpha4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors in vivo.
Immunity 11**:** 555-66.

Assaf N, Hasson T, Hoch-Marchaim H, Pe'er J, Gnessin H, Deckert-Schlüter M, Wiestler OD, Hochman J (1997)
An experimental model for infiltration of malignant lymphoma to the eye and brain.
Virchows Arch 431**:** 459-67.

Awatsuji H, Furukawa Y, Nakajima M, Furukawa S, Hayashi K (1993)
Interleukin-2 as a neurotrophic factor for supporting the survival of neurons cultured from various regions of fetal rat brain.
J Neurosci Res 35**:** 305-11.

Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA, Jr. (1993)
Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma.
J Exp Med 177**:** 57-68.

Barten DM, Ruddle NH (1994)
Vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis.
J Neuroimmunol 51**:** 123-33.

Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB (1994)
Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells.
Nature 372**:** 691-4.

Bendelac A, Killeen N, Littman DR, Schwartz RH (1994)
A subset of $CD4^+$ thymocytes selected by MHC class I molecules.
Science 263**:** 1774-8.

Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR (1995)
CD1 recognition by mouse $NK1^+$ T lymphocytes.
Science 268**:** 863-5.

Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH (1997)
Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function.
Annu Rev Immunol 15**:** 535-62.

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR (1998)
Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.
Nature 393**:** 478-80.

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR (1997)
Induction of a $CD8^+$ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate $CD4^+$ T cell help.
J Exp Med 186**:** 65-70.

Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY (2000)
Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection.
J Immunol 165**:** 4515-21.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A (2000)
The role of nitric oxide in innate immunity.
Immunol Rev 173**:** 17-26.

Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C (1991)
Macrophage deactivation by interleukin 10.
J Exp Med 174**:** 1549-55.

Brown CR, Hunter CA, Estes RG, Beckmann E, Forman J, David C, Remington JS, McLeod R (1995)
Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis.
Immunology 85**:** 419-28.

Buckner FS, Wipke BT, Van Voorhis WC (1997)
Trypanosoma cruzi infection does not impair major histocompatibility complex class I presentation of antigen to cytotoxic T lymphocytes.
Eur J Immunol 27**:** 2541-8.

Buller RM, Holmes KL, Hugin A, Frederickson TN, Morse HC, 3rd (1987)
Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells.
Nature 328**:** 77-9.

Burkly LC, Jakubowski A, Newman BM, Rosa MD, Chi-Rosso G, Lobb RR (1991)
Signaling by vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through VLA-4 promotes CD3-dependent T cell proliferation.
Eur J Immunol 21**:** 2871-5.

Burns LJ, Pooley JC, Walsh DJ, Vercellotti GM, Weber ML, Kovacs A (1999)
Intercellular adhesion molecule-1 expression in ECs is activated by cytomegalovirus immediate early proteins.
Transplantation 67**:**137-144.

Candolfi E, Hunter CA, Remington JS (1994)
Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates.
Infect Immun 62**:** 1995-2001.

Canessa A, Pistoia V, Roncella S, Merli A, Melioli G, Terragna A, Ferrarini M (1988)
An in vitro model for *Toxoplasma* infection in man. Interaction between $CD4^+$ monoclonal T cells and macrophages results in killing of trophozoites.
J Immunol 140**:** 3580-8.

Cardell S, Tangri S, Chan S, Kronenberg M, Benoist C, Mathis D (1995)
CD1-restricted $CD4^+$ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice.
J Exp Med 182**:** 993-1004.

Cardin RD, Brooks JW, Sarawar SR, Doherty PC (1996)
Progressive loss of $CD8^+$ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of $CD4^+$ T cells.
J Exp Med 184**:** 863-71.

Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri MA (1995)
Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro.
J Clin Invest 96**:** 2578-82.

Casciotti L, Ely KH, Williams ME, Khan IA (2002)
CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells.
Infect Immun 70**:** 434-43.

Chao CC, Anderson WR, Hu S, Gekker G, Martella A, Peterson PK (1993)
Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism.
Clin Immunol Immunopathol 67**:** 178-83.

Chen H, Paul WE (1997)
Cultured $NK1.1^+$ $CD4^+$ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1.
J Immunol 159**:** 2240-9.

Chen H, Paul WE (1998)
A population of CD62Llow Nk1.1- $CD4^+$ T cells that resembles $NK1.1^+$ $CD4^+$ T cells.
Eur J Immunol 28**:** 3172-82.

Curiel TJ, Krug EC, Purner MB, Poignard P, Berens RL (1993)
Cloned human $CD4^+$ cytotoxic T lymphocytes specific for *Toxoplasma gondii* lyse tachyzoite-infected target cells.
J Immunol 151**:** 2024-31.

Cyster JG (1999)
Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.
Science 286**:** 2098-102.

Damle NK, Klussman K, Linsley PS, Aruffo A, Ledbetter JA (1992)
Differential regulatory effects of intercellular adhesion molecule-1 on costimulation by the CD28 counter-receptor B7.
J Immunol 149**:** 2541-8.

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G (1993)
Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells.
J Exp Med 178**:** 1041-8.

Darji A, Chakraborty T, Wehland J, Weiss S (1997)
TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of soluble proteins using listeriolysin.
Eur J Immunol 27**:** 1353-9.

Deckert-Schlüter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, Schlüter D (1998)
Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis.
J Immunol 160**:** 3427-36.

Deckert-Schlüter M, Rang A, Weiner D, Huang S, Wiestler OD, Hof H, Schlüter D (1996)
Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation.
Lab Invest 75**:** 827-41.

Deckert-Schlüter M, Schlüter D, Hof H, Wiestler OD, Lassmann H (1994)
Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study.
J Neuropathol Exp Neurol 53**:** 457-68.

Denkers EY, Gazzinelli RT (1998)
Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection.
Clin Microbiol Rev 11**:** 569-88.

Denkers EY, Gazzinelli RT, Martin D, Sher A (1993)
Emergence of $NK1.1^+$ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice.
*J Exp Med 1*78**:** 1465-72.

Denkers EY, Scharton-Kersten T, Barbieri S, Caspar P, Sher A (1996)
A role for $CD4^+$ $NK1.1^+$ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of $CD8^+$ effector function against intracellular infection.
J Exp Med 184**:** 131-9.

Denkers EY, Sher A (1997)
Role of natural killer and $NK1^+$ T-cells in regulating cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection.
Biochem Soc Trans 25**:** 699-703.

Denkers EY, Yap G, Scharton-Kersten T, Charest H, Butcher BA, Caspar P, Heiny S, Sher A (1997)
Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 159**:** 1903-8.

Doherty TM, Seder RA, Sher A (1996)
Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages.
J Immunol 156**:** 735-41.

Doolan DL, Hoffman SL (1999)
IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by $CD8^+$ T cells in the Plasmodium yoelii model.
J Immunol 163**:** 884-92.

Dopp JM, Breneman SM, Olschowka JA (1994)
Expression of ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and leukosialin in the mouse central nervous system during the induction and remission stages of experimental allergic encephalomyelitis.
J Neuroimmunol 54**:** 129-44.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA (1998)
Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.
Clin Microbiol Rev 11**:** 267-99.

Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R (1998)
Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing.
Am J Pathol 153**:** 1849-60.

Ferguson DJ, Hutchison WM (1987)
An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice.
Parasitol Res 73**:** 483-91.

Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE (1990)
Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection.
Annu Rev Immunol 8**:** 303-33.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991)
IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.
J Immunol 147**:** 3815-22.

Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Hadding U (1997)
Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells.
Eur J Immunol 27**:** 1539-48.

Freedman AS, Munro JM, Rice GE, Bevilacqua MP, Morimoto C, McIntyre BW, Rhynhart K, Pober JS, Nadler LM (1990)
Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110.
Science 249**:** 1030-3.

Gajewski TF, Goldwasser E, Fitch FW (1988)
Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
*J Immunol 1*41**:** 2635-42.

Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A (1992)
Simultaneous depletion of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 149**:** 175-80.

Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A (1996a)
Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*.
Curr Top Microbiol Immunol 219**:** 127-39.

Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A (1991)
Synergistic role of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine.
J Immunol 146**:** 286-92.

Gazzinelli RT, Hayashi S, Wysocka M, Carrera L, Kuhn R, Muller W, Roberge F, Trinchieri G, Sher A (1994a)
Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide.
*J Eukaryot Microbiol 4*1**:** 9S.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A (1993)
Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts.
Proc Natl Acad Sci U S A 90**:** 6115-9.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A (1994b)
Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 153**:** 2533-43.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharton-Kersten T, Cheever A, Kuhn R, Muller W, Trinchieri G, Sher A (1996b)
In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on $CD4^+$ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha.
J Immunol 157**:** 798-805.

Grabstein KH, Namen AE, Shanebeck K, Voice RF, Reed SG, Widmer MB (1990)
Regulation of T cell proliferation by IL-7.
J Immunol 144**:** 3015-20.

Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI (1995)
Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation.
Genes Dev 9**:** 1-14.

Halonen SK, Chiu F, Weiss LM (1998a)
Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes.
Infect Immun 66**:** 4989-93.

Halonen SK, Weiss LM, Chiu FC (1998b)
Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes in vitro.
Int J Parasitol 28**:** 815-23.

Handman E, Remington JS (1980)
Antibody responses to *toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence.
Infect Immun 29**:** 215-20.

Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli R, Roberge FG (1996)
Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis.
J Immunol 156**:** 1476-81.

Hickey WF, Kimura H (1988)
Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo.
Science 239**:** 290-2.

Hochman J, Assaf N, Deckert-Schlüter M, Wiestler OD, Pe'er J (2001)
Entry routes of malignant lymphoma into the brain and eyes in a mouse model.
Cancer Res 61**:** 5242-7.

Hunter CA, Abrams JS, Beaman MH, Remington JS (1993)
Cytokine mRNA in the central nervous system of SCID mice infected with *Toxoplasma gondii*: importance of T-cell-independent regulation of resistance to T. gondii.
Infect Immun 61**:** 4038-44.

Hunter CA, Chizzonite R, Remington JS (1995)
IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens.
J Immunol 155**:** 4347-54.

Hunter CA, Ellis-Neyer L, Gabriel KE, Kennedy MK, Grabstein KH, Linsley PS, Remington JS (1997)
The role of the CD28/B7 interaction in the regulation of NK cell responses during infection with *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 158**:** 2285-93.

Hunter CA, Remington JS (1994)
Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis.
J Infect Dis 170**:** 1057-67.

Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS (1989)
Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection.
J Clin Microbiol 27**:** 2031-8.

Israelski DM, Araujo FG, Conley FK, Suzuki Y, Sharma S, Remington JS (1989)
Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis.
J Immunol 142**:** 954-8.

James SL (1995)
Role of nitric oxide in parasitic infections.
Microbiol Rev 59**:** 533-47.

Johnson LL, Sayles PC (2002)
Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice.
Infect Immun 70**:** 185-91.

Jones TC, Bienz KA, Erb P (1986)
In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon.
Infect Immun 51**:** 147-56.

Kang H, Remington JS, Suzuki Y (2000)
Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase.
J Immunol 164**:** 2629-34.

Karpus WJ, Kennedy KJ (1997)
MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation.
J Leukoc Biol 62**:** 681-7.

Kasper LH, Matsuura T, Khan IA (1995)
IL-7 stimulates protective immunity in mice against the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 155**:** 4798-804.

Keene JA, Forman J (1982)
Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes.
J Exp Med 155**:** 768-82.

Khan IA, Ely KH, Kasper LH (1994)
Antigen-specific $CD8^+$ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice.
J Immunol 152**:** 1856-60.

Khan IA, Kasper LH (1996)
IL-15 augments $CD8^+$ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice.
J Immunol 157**:** 2103-8.

Khan IA, MacLean JA, Lee FS, Casciotti L, DeHaan E, Schwartzman JD, Luster AD (2000)
IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection.
Immunity 12**:** 483-94.

Koni PA, Joshi SK, Temann UA, Olson D, Burkly L, Flavell RA (2001)
Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow.
J Exp Med 193**:** 741-54.

Kontgen F, Suss G, Stewart C, Steinmetz M, Bluethmann H (1993)
Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice.
Int Immunol 5**:** 957-64.

Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, Newman W, Shimizu Y, van Seventer GA, de Groot C, Pals ST (1994)
Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells.
J Immunol 152**:** 3760-7.

Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, Zhou DF, de Groot C, Pals ST (1997)
Germinal center B cells rescued from apoptosis by CD40 ligation or attachment to follicular dendritic cells, but not by engagement of surface immunoglobulin or adhesion receptors, become resistant to CD95-induced apoptosis.
Eur J Immunol 27**:** 1-7.

Koopman G, Parmentier HK, Schuurman HJ, Newman W, Meijer CJ, Pals ST (1991)
Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways.
J Exp Med 173**:** 1297-304.

Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, Buck CA, Labow MA (1995)
Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice.
Development 121**:** 489-503.

Kwok LY, Lutjen S, Soltek S, Soldati D, Busch D, Deckert M, Schlüter D (2003)
The induction and kinetics of antigen-specific CD8 T cells are defined by the stage specificity and compartmentalization of the antigen in murine toxoplasmosis.
J Immunol 170**:** 1949-57.

Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Hiemstra PS, Fransen L, Van Furth R (1992a)
IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha.
J Immunol 148**:** 568-74.

Langermans JA, van der Hulst ME, Nibbering PH, van Furth R (1992b)
Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice.
Infect Immun 60**:** 5107-12.

Laschinger M, Engelhardt B (2000)
Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro.
J Neuroimmunol 102**:** 32-43.

Lassmann H (1991)
Inflammation and the blood-brain barrier.
Brain Pathol 1**:** 88.

Leist TP, Kohler M, Zinkernagel RM (1989)
Impaired generation of anti-viral cytotoxicity against lymphocytic choriomeningitis and vaccinia virus in mice treated with CD4-specific monoclonal antibody.
Scand J Immunol 30**:** 679-86.

Leuker CE, Labow M, Muller W, Wagner N (2001)
Neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene impairs B cell localization and T cell-dependent humoral immune response.
J Exp Med 193**:** 755-68.

Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G (1996)
The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells.
J Exp Med 183**:** 147-57.

McLeod R, Skamene E, Brown CR, Eisenhauer PB, Mack DG (1989)
Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of A x B/B x A recombinant inbred and B10 congenic mice.
J Immunol 143**:** 3031-4.

McManus CM, Brosnan CF, Berman JW (1998)
Cytokine induction of MIP-1 alpha and MIP-1 beta in human fetal microglia.
J Immunol 160**:** 1449-55.

Medina E, Paglia P, Rohde M, Colombo MP, Guzman CA (2000)
Modulation of host immune responses stimulated by Salmonella vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen.
Eur J Immunol 30**:** 768-77.

Miyake K, Medina K, Ishihara K, Kimoto M, Auerbach R, Kincade PW (1991)
A VCAM-like adhesion molecule on murine bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture.
J Cell Biol 114**:** 557-65.

Montoya JG, Lowe KE, Clayberger C, Moody D, Do D, Remington JS, Talib S, Subauste CS (1996)
Human $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells.
Infect Immun 64**:** 176-81.

Moretto M, Casciotti L, Durell B, Khan IA (2000)
Lack of CD4(+) T cells does not affect induction of CD8(+) T-cell immunity against Encephalitozoon cuniculi infection.
Infect Immun 68**:** 6223-32.

Murray HW, Cohn ZA (1979)
Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates.
J Exp Med 150**:** 938-49.

Nagasawa H, Manabe T, Maekawa Y, Oka M, Himeno K (1991)
Role of $L3T4^+$ and $Lyt\text{-}2^+$ T cell subsets in protective immune responses of mice against infection with a low or high virulent strain of *Toxoplasma gondii*.
Microbiol Immunol 35**:** 215-22.

Nakano Y, Hisaeda H, Sakai T, Zhang M, Maekawa Y, Zhang T, Nishitani M, Ishikawa H, Himeno K (2001)
Granule-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by $CD8^+$ T cells.
Immunology 104**:** 289-98.

Overwijk WW, Surman DR, Tsung K, Restifo NP (1997)
Identification of a Kb-restricted CTL epitope of beta-galactosidase: potential use in development of immunization protocols for "self" antigens.
Methods 12**:** 117-23.

Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS (1995)
The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen.
Proc Natl Acad Sci U S A 92**:** 9647-51.

Papayannopoulou T, Nakamoto B (1993)
Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin.
Proc Natl Acad Sci U S A 90**:** 9374-8.

Purner MB, Berens RL, Nash PB, van Linden A, Ross E, Kruse C, Krug EC, Curiel TJ (1996)
CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans.
Infect Immun 64**:** 4330-8.

Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Schilham MW, Kundig TM, Sambhara SR, Narendran A, Arabian A, Wakeham A, Paige CJ, Zinkernagel RM, et al. (1991)
Normal development and function of $CD8^+$ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4.
*Nature 3*53**:** 180-4.

Rammensee HG, Schild H, Theopold U (1989)
Protein-specific cytotoxic T lymphocytes. Recognition of transfectants expressing intracellular, membrane-associated or secreted forms of beta-galactosidase.
*Immunogenetics 3*0**:** 296-302.

Ransohoff RM (1997)
Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression patterns and inflammatory pathology.
J Leukoc Biol 62: 645-52.

Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P (1998)
A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a $CD4^+$ T-helper and a T-killer cell.
Nature 393: 474-8.

Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari H, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J (1996)
Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection.
Infect Immun 64: 897-904.

Sayles PC, Gibson GW, Johnson LL (2000)
B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 68: 1026-33.

Scharton-Kersten T, Caspar P, Sher A, Denkers EY (1996)
Toxoplasma gondii: evidence for interleukin-12-dependent and-independent pathways of interferon-gamma production induced by an attenuated parasite strain.
Exp Parasitol 84: 102-14.

Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A (1997)
Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii.*
J Exp Med 185: 1261-73.

Schlegel PG, Vaysburd M, Chen Y, Butcher EC, Chao NJ (1995)
Inhibition of T cell costimulation by VCAM-1 prevents murine graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers.
J Immunol 155: 3856-65.

Schlüter D, Deckert-Schlüter M, Lorenz E, Meyer T, Rollinghoff M, Bogdan C (1999)
Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in T. gondii-resistant BALB/c mice.
J Immunol 162: 3512-8.

Schlüter D, Deckert-Schlüter M, Schwendemann G, Brunner H, Hof H (1993)
Expression of major histocompatibility complex class II antigens and levels of interferon-gamma, tumour necrosis factor, and interleukin-6 in cerebrospinal fluid and serum in *Toxoplasma gondii*-infected SCID and immunocompetent C.B-17 mice.
Immunology 78: 430-5.

Schlüter D, Hein A, Dorries R, Deckert-Schlüter M (1995)
Different subsets 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.

Schlüter D, Kaefer N, Hof H, Wiestler OD, Deckert-Schlüter M (1997)
Expression pattern and cellular origin of cytokines in the normal and *Toxoplasma gondii*-infected murine brain.
Am J Pathol 150: 1021-35.

Schlüter D, Lohler J, Deckert M, Hof H, Schwendemann G (1991)
Toxoplasma encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products.
J Neuroimmunol 31**:** 185-98.

Schlüter D, Meyer T, Kwok LY, Montesinos-Rongen M, Lutjen S, Strack A, Schmitz ML, Deckert M (2002)
Phenotype and regulation of persistent intracerebral T cells in murine *Toxoplasma* encephalitis.
*J Immunol 1*69**:** 315-22.

Schlüter D, Meyer T, Strack A, Reiter S, Kretschmar M, Wiestler OD, Hof H, Deckert M (2001)
Regulation of microglia by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells: selective analysis in CD45-congenic normal and *Toxoplasma gondii*-infected bone marrow chimeras.
Brain Pathol 11**:** 44-55.

Schönberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ (1998)
T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.
Nature 393**:** 480-3.

Schreiber RD, Feldman HA (1980)
Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway.
J Infect Dis 141**:** 366-9.

Shahgaseempour S, Woodroffe SB, Garnett HM (1997)
Alterations in the expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 after in vitro infection of ECs with a clinical isolate of human cytomegalovirus,
Microbiol Immunol 41**:**121-129

Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, Berzofsky JA, Mosmann TR, James SL, Morse HC, 3rd (1992)
Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection.
Immunol Rev 127**:** 183-204.

Sibley LD, Lawson R, Weidner E (1986)
Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*.
Mol Biochem Parasitol 19**:** 83-7.

Silva NM, Rodrigues CV, Santoro MM, Reis LF, Alvarez-Leite JI, Gazzinelli RT (2002)
Expression of 2,3-Dioxygenase, tryptophan degradation and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: Induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1.
Infect Immun 70**:** 859-868.

Suzuki Y, Joh K, Kwon OC, Yang Q, Conley FK, Remington JS (1994)
MHC class I gene(s) in the D/L region but not the TNF-alpha gene determines development of toxoplasmic encephalitis in mice.
J Immunol 153**:** 4649-54.

Suzuki Y, Kobayashi A (1985)
Requirement for calcium ions in antibody-dependent complement-mediated cytolysis of *Toxoplasma gondii*.
Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 259**:** 426-31.

Suzuki Y, Remington JS (1988)
Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice.
J Immunol 140**:** 3943-6.

Suzuki Y, Yang Q, Yang S, Nguyen N, Lim S, Liesenfeld O, Kojima T, Remington JS (1996)
IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis.
J Immunol 157**:** 2564-9.

Tangri S, Brossay L, Burdin N, Lee DJ, Corr M, Kronenberg M (1998)
Presentation of peptide antigens by mouse CD1 requires endosomal localization and protein antigen processing.
Proc Natl Acad Sci U S A 95**:** 14314-9.

Terry RW, Kwee L, Baldwin HS, Labow MA (1997)
Cre-mediated generation of a VCAM-1 null allele in transgenic mice.
Transgenic Res 6: 349-56.

Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, Kast WM, Offringa R, Melief CJ (1998)
Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells.
J Immunol 160**:** 4449-56.

Trinchieri G, Kubin M, Bellone G, Cassatella MA (1993)
Cytokine cross-talk between phagocytic cells and lymphocytes: relevance for differentiation/activation of phagocytic cells and regulation of adaptive immunity.
J Cell Biochem 53**:** 301-8.

Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER (1993)
Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist.
Proc Natl Acad Sci U S A 90**:** 3725-9.

Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C (1988)
Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta.
Nature 334**:** 260-2.

van Hall T, van de Rhee NE, Schoenberger SP, Vierboom MP, Verreck FA, Melief CJ, Offringa R (1998)
Cryptic open reading frames in plasmid vector backbone sequences can provide highly immunogenic cytotoxic T-lymphocyte epitopes.
Cancer Res 58**:** 3087-93.

Villegas EN, Elloso MM, Reichmann G, Peach R, Hunter CA (1999)
Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 163**:** 3344-53.

Villegas EN, Lieberman LA, Carding SR, Hunter CA (2002)
Susceptibility of interleukin-2-deficient mice to *Toxoplasma gondii* is associated with a defect in the production of gamma interferon.
Infect Immun 70**:** 4757-61.

Vollmer TL, Waldor MK, Steinman L, Conley FK (1987)
Depletion of T-4$^+$ lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system: a model of superinfection in AIDS.
J Immunol 138**:** 3737-41.

von Herrath MG, Yokoyama M, Dockter J, Oldstone MB, Whitton JL (1996)
CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge.
J Virol 70**:** 1072-9.

Wilson CB, Tsai V, Remington JS, (1980)
Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens.
J Exp Med 151**:** 328-46.

Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K (1999)
In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1.
J Neuropathol Exp Neurol 58**:** 138-52.

Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N (1992)
Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin.
Nature 356**:** 63-6.

Yoshimoto T, Paul WE (1994)
CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3.
J Exp Med 179**:** 1285-95.

Zach O, Bauer HC, Richter K, Webersinke G, Tontsch S, Bauer H (1997)
Expression of a chemotactic cytokine (MCP-1) in cerebral capillary endothelial cells in vitro.
Endothelium 5**:** 143-53.

Zietz C, Hotz B, Sturzl M, Rauch E, Penning R, Lohrs U (1996)
Aortic endothelium in HIV-1 infection: chronic injury, activation, and increased leukocyte adherence.
Am J Pathol 149**:** 1887-98.

Publikationen

Deckert M, Lütjen S, Leuker CE, Kwok LY, Müller W, Wagner N, Schlüter D (2003)
Mice with neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule-1 fail to control the parasite in *Toxoplasma* encephalitis.
***Eur J Immunol* 33: 1418-28.**

Kwok LY, Lütjen S, Soltek S, Soldati D, Busch D, Deckert M, Schlüter D (2003)
The induction and kinetics of antigen-specific CD8 T cells are defined by the stage specificity and compartmentalization of the antigen in murine toxoplasmosis.
J Immunol 170**:** 1949-57.

Kwok LY, Miletic H, Lütjen S, Soltek S, Deckert M, Schlüter D (2002)
Protective immunosurveillance of the central nervous system by *Listeria*-specific CD4 and CD8 T cells in systemic listeriosis in the absence of intracerebral *Listeria*.
J Immunol 169**:** 2010-9.

Schlüter D, Meyer T, Kwok LY, Montesinos-Rongen M, Lütjen S, Strack A, Schmitz ML, Deckert M (2002)
Phenotype and regulation of persistent intracerebral T cells in murine *Toxoplasma* encephalitis.
*J Immunol 1*69**:** 315-22.

Deckert M, Soltek S, Geginat G, Lütjen S, Montesinos-Rongen M, Hof H, Schlüter D (2001)
Endogenous interleukin-10 is required for prevention of a hyperinflammatory intracerebral immune response in *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis.
Infect Immun 69**:** 4561-71.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Sonja Lütjen
Geburtsdatum:	07.03.1972
Geburtsort:	Bremen
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Schulbildung:

1985 – 1989	Sek. I, Schulzentrum a.d. Carl-Goerdeler-Straße, Bremen
1989 – 1990	Auslandsaufenthalt: USA, Kalifornien San Dieguito High School
1990 – 1993	Sek. II, Schulzentrum a.d. Kurt-Schumacher-Allee, Bremen Abschluss: Abitur (Durchschnittsnote: gut)

Studium:

15.10.1993 – 15.09.1999	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg Hauptfach: Mikrobiologie 1. Nebenfach: Genetik 2. Nebenfach: Immunologie 3. Nebenfach: Biochemie Abschluss: Diplom (Gesamtnote: sehr gut)
16.02.1998 – 29.05.1998	Praktikum bei BASF
18.10.1999 – 31.01.2000	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart
seit 02.04.2000	Promotion am Fachbereich für Biologie der Philipps-Universität Marburg mit dem Thema: „Funktionelle Bedeutung von VCAM-1 und $CD4^+$ T-Zellen für die Induktion einer protektiven Immunantwort bei der murinen Toxoplasmose“. Die praktische Durchführung der Arbeit erfolgte am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Mannheim, Universität Heidelberg

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Lingelbach, der es mir überhaupt erst ermöglicht hat, meine Promotion in Mannheim durchführen zu können und mich während der ganzen Zeit unterstützt hat.

Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Schlüter möchte ich für die fortwährende Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotion danken.

Herrn Prof. Dr. H. Hof danke ich für seine Unterstützung und die stetige Diskussionsbereitschaft .

Bei Frau Prof. Dr. M. Deckert möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere bei der Beurteilung der histologischen Untersuchungen bedanken.

Außerdem danke ich meinen Arbeitskolleginnen Zoi Edinger, Sabine Soltek, Nadja Schlüter, Simona Virna und Lai Yu Kwok für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene sowie des Tierhauses, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Meiner Schwester Simone danke ich für ihre kritische Beurteilung der Arbeit. Ihr ist so leicht kein Fehler entgangen!

Schließlich möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinem Mann Heiko bedanken, der mich während der ganzen Zeit unterstützt hat und nie müde wurde, mir zu zuhören.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Funktionelle Bedeutung von VCAM-1 und $CD4^+$ T-Zellen für die Induktion einer protektiven Immunantwort bei der murinen Toxoplasmose“

selbständig ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen Zeit oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Mannheim, den 09.06.2003 Sonja Lütjen