

**Funktion der astrozytär und neuronal
exprimierten Rezeptoruntereinheit gp130 bei der
murinen *Toxoplasma*-Enzephalitis**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biologin Ulrike Händel, geb. Helmuth

geb. am 22.März 1973 in Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr. med. Dirk Schlüter

Prof. Dr. rer. nat. Carsten Lüder

eingereicht am 29.Mai 2012

verteidigt am 23.Oktober 2012

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dirk Schlüter für die Möglichkeit bedanken, unter seiner Betreuung diese Dissertation anfertigen zu dürfen. Seine allzeit unkomplizierte Unterstützung und Geduld, sowie die immer freundliche und gute Zusammenarbeit waren für mich von großer Bedeutung. Bedanken möchte ich mich auch dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, an Kongressen teilzunehmen und für die Korrektur der Arbeit.

Frau Professor Martina Deckert und Elena Fischer danke ich für die große Unterstützung bei der Anfertigung, Färbung und Auswertung der histologischen Präparate.

Ein besonderer Dank gilt auch an Fr. Dr. Katrin Drögemüller, die mich zu Beginn der Arbeit in die Arbeitstechniken eingeführt hat und maßgeblich zum Gelingen der Promotion beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, die stets ein offenes Ohr, gute Ratschläge und Hilfe parat hatten. Vielen Dank an die TAs Annette Sohnekind, Nadja Schlüter und Dana Zabler für ihre stets freundliche Unterstützung und Anita Marquardt für die Zucht der Mäuse.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Roland Hartig für die Unterstützung bei der Fluoreszenzmikroskopie bedanken.

Ein großer Dank geht auch an den ehemaligen Institutsdirektor Prof. Wolfgang König und alle Mitarbeiter der Mikrobiologie, die mich sehr nett aufgenommen haben und bei Problemen stets hilfsbereit waren.

Ich danke meinen Freunden für ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und ihren immerwährenden Optimismus. Ein besonderer Dank gilt Dr. Sabine Brandt, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, um labortechnische, computertechnische oder Allerweltsfragen zu klären.

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die immerwährende Unterstützung und Hilfe vor und während der Promotionszeit bedanken. Ein besonderer Gruß gilt auch meinen Kindern, die mir mit ihrem Lachen und ihrer Liebe den Alltag versüßen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung akzeptiert:

Katrin Drögemüller, **Ulrike Helmuth**, Anna Brunn, DH Gutmann, Werner Müller, Martina Deckert, Dirk Schlüter

Astrocyte gp130 expression is critical for the control of *Toxoplasma* encephalitis
Journal of Immunology, 15. August 2008, 181(4):2683-93

Ulrike Händel, Anna Brunn, Katrin Drögemüller, Werner Müller, Martina Deckert, Dirk Schlüter

Neuronal gp130 expression is crucial to prevent neuronal loss, hyperinflammation, and lethal course of murine *Toxoplasma* encephalitis

Akzeptiert im American Journal of Pathology, Februar 2012

Weitere Publikationen

Sakowicz-Burkiewicz,M.; Nishanth,G.; **Helmuth,U.**; Drögemüller,K.; Busch,D.H.; Utermöhlen,O.; Naumann,M.; Deckert,M.; Schlüter,D.

Protein kinase C-theta critically regulates the proliferation and survival of pathogen-specific T cells in murine listeriosis

J.Immunol. 15. April 2008, 180(8):5601-12

Protective *Toxoplasma gondii*-specific T-cell responses require T-cell-specific expression of protein kinase C-theta.

Nishanth G, Sakowicz-Burkiewicz M, **Händel U**, Kliche S, Wang X, Naumann M, Deckert M, Schlüter D.

Infect Immun. August 2010, 78(8):3454-64

Haroon F, Drögemüller K, **Händel U**, Brunn A, Reinhold D, Nishanth G, Mueller W, Trautwein C, Ernst M, Deckert M, Schlüter D.

Gp130-dependent astrocytic survival is critical for the control of autoimmune central nervous system inflammation.

J Immunol. 1. Juni 2011, 186(11):6521-31

Fahad Haroon, **Ulrike Händel**, Frank Angenstein, Jürgen Goldschmidt, Peter Kreutzmann, Holger Lison, Klaus-Dieter Fischer, Henning Scheich, Wolfram Wetzell, Dirk Schlüter, Eike Budinger

Toxoplasma gondii actively inhibits neuronal function in chronically infected mice
PLoS One. 2012;7(4):e35516. Epub 2012 Apr 18

I. Inhalt

<u>I.</u>	<u>Inhalt.....</u>	<u>I</u>
<u>II.</u>	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>V</u>
<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1	Der Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.2	Medizinische Bedeutung	4
1.2	Immunologie der Toxoplasmose	6
1.3	Mausmodelle der Toxoplasmose.....	8
1.4	Die Zytokine der IL-6 Familie und der gp130 Signalweg	9
1.4.1	Die Zytokine der IL-6 Familie	9
1.4.2	Die Rezeptoren der IL-6 Zytokinfamilie.....	11
1.4.3	Die Rezeptoruntereinheit gp130 und der gp130-vermittelte Signalweg.....	12
1.5	Geninaktivierung in konditionalen knockout Mausmodellen	14
1.5.1	Konstitutive Inaktivierung des gp130 Gens	14
1.5.2	Zelltypspezifische Inaktivierung des gp130 Gens	15
1.6	Zielstellung der Arbeit	16
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	<u>17</u>
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien für tierexperimentelle Arbeiten.....	17
2.1.2	Zellkulturarbeiten	17
2.1.3	Material für biochemische Arbeiten.....	18
2.1.4	Material für proteinbiochemische Arbeiten	21
2.1.4.1	SDS-PAGE und Western Blot.....	21
2.1.4.2	ELISA.....	22
2.1.4.3	Durchflusszytometrie	23

2.1.4.4	LDH-Assay.....	25
2.1.5	Material für Immunzytochemie.....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	tierexperimentelle Methoden.....	26
2.2.1.1	Zucht gentechnisch veränderter Mauslinien	26
2.2.1.2	Infektion von Mäusen mit <i>T. gondii</i>	28
2.2.1.3	Organentnahme aus adulten Mäusen.....	28
2.2.1.4	Präparation neonataler Astrozytenkulturen und embryonaler Neuronenkulturen.....	29
2.2.2	Zellkulturtechniken	29
2.2.2.1	Vorbereitung der Zellkulturmaterialien	29
2.2.2.2	Astrozytenkultur.....	29
2.2.2.3	Neuronenkultur.....	30
2.2.2.4	Kultivierung von HFF-Zellen.....	31
2.2.2.5	Zucht von Toxoplasmen in der Zellkultur.....	31
2.2.2.6	Ermittlung der Zellzahl mit Trypanblau.....	31
2.2.2.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
2.2.2.8	Stimulation kultivierter Zellen	32
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	33
2.2.3.2	Isolierung genomischer DNA aus Organen und Toxoplasmen.....	33
2.2.3.3	Genotypisierung der Mäuse und Nachweis der Deletion mittels PCR	33
2.2.3.4	Isolation von mRNA aus aus Gewebe und Generierung von cDNA	34
2.2.3.5	Semiquantitative RT-PCR.....	36
2.2.3.6	RT-PCR.....	36

2.2.3.7	Real-time PCR.....	37
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.2.4.1	Isolation von Gesamtzellproteinen aus kultivierten Zellen.....	38
2.2.4.2	SDS-PAGE.....	39
2.2.4.3	Western Blot.....	39
2.2.4.4	TGF- β 1-, TGF- β 2- und IL-27-ELISA.....	40
2.2.4.5	LDH-Assay.....	40
2.2.5	Immunzytochemische Methoden.....	40
2.2.5.1	Färbung apoptotischer Zellen.....	40
2.2.5.2	Fluoreszenzmarkierung von Neuronen, Astrozyten und Toxoplasmen.....	41
2.2.5.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	41
2.2.5.4	Isolation zerebraler Leukozyten.....	41
2.2.5.5	Durchflusszytometrie.....	42
2.2.6	Histologische Methoden.....	43
2.2.6.1	histologische Übersichtsfärbungen paraffinfixierter Gehirne.....	43
2.2.6.2	Immunhistochemische Methoden.....	44
2.2.7	Statistik.....	45
3	<u>Ergebnisse</u>	46
3.1	Etablierung von Mauslinien mit einer Deletion des gp130 Gens in Astrozyten oder Neuronen.....	46
3.2	Zytokine der IL-6-Familie wurden bei der TE hochreguliert.....	47
3.3	Der Einfluss der neuronalen gp130-Expression auf den Verlauf der TE.....	49
3.3.1	Die neuronale gp130-Expression schützte vor einer letalen TE.....	49
3.3.2	Verminderte Parasitenkontrolle im Gehirn von Synapsin-Cre gp130 ^{fl/fl} Mäusen.....	49
3.3.3	Verstärkte Entzündungsreaktionen und dysregulierte Zytokinproduktion in Gehirnen der Synapsin-Cre gp130 ^{fl/fl} Mäuse.....	51

3.3.4	Die neuronale gp130 Expression verhinderte einen Neuronenverlust bei der TE.....	56
3.3.5	Die gp130 Expression kultivierter Neuronen schützte vor einer <i>T. gondii</i> induzierten Apoptose <i>in vitro</i>	58
3.3.6	Einfluss der neuronalen gp130 Expression auf die Invasion und Replikation des Parasiten <i>in vitro</i>	60
3.4	Der Einfluss der astrozytären gp130-Expression auf den Verlauf der TE.....	62
3.4.1	Die astrozytäre gp130-Expression schützte vor einem letalen Verlauf der TE.....	62
3.4.2	Die erhöhte Letalität der hGFAP-Cre gp130 ^{fl/fl} Tiere ging mit einer gestörten Parasitenkontrolle einher.....	62
3.4.3	Verlust von Astrozyten in <i>T.gondii</i> -infizierten hGFAP-Cre gp130 ^{fl/fl} Mäusen.....	64
3.4.4	Einfluss des Astrozytenverlustes auf die Zytokinexpression.....	68
3.4.5	Rekrutierung von Leukozyten in das infizierte Gehirn.....	70
3.4.6	Die Wirkung der <i>T. gondii</i> Infektion auf gp130-defiziente Astrozyten <i>in vitro</i>	71
<u>4</u>	<u>Diskussion</u>	<u>74</u>
<u>5</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>86</u>
	<u>Erklärung</u>	<u>105</u>
	<u>Lebenslauf</u>	<u>106</u>

II. Abkürzungsverzeichnis

A

A. dest	destilliertes Wasser
Anti FcR	anti Fc-Rezeptor
APC	Allophycocyanin

B

BAG1	Bradyzoiten-Antigen 1
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin

C

CCD	<i>charged-coupled device</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CXCL-10	<i>C-X-C motif chemokine-10</i> (vormals auch IP-10)
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CNTFR	CNTF-Rezeptor
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
cDNA	komplementäre DNA
Cy2	Cyanin-Farbstoff 2
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3

D

d	Tag
DAB	3,3'- Diaminobenzidin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindoledihydrochloride
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DC	dendritische Zelle

E

E18,5	Embryonaltag 18,5
EBI3	<i>Ebstein-Barr virus induced gene 3</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	extrazelluläre signalregulierte Kinase

F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum

fl/fl	auf beiden Allelen <i>loxP</i> -flankierter Genabschnitt
G	
g	Gravitationsbeschleunigung
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTPase	Enzym, das Guanosintriphosphat verwendet
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Gp130	Glykoprotein 130
H	
HFF	<i>human foreskin fibroblast</i>
hGFAP	humanes GFAP
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPF	<i>high power field</i>
HPRT	<i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
I	
IL	Interleukin
IL-6R	IL-6-Rezeptor
IL-11R	IL-11-Rezeptor
IFN	Interferon
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IGTP	Interferon- γ induzierte Kinase
IIGP	Interferon- γ induzierte Kinase
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgA	Immunglobulin A
J	
JAK	Janus Kinase
L	
LDH	Laktatdehydrogenase
LIF	<i>leucemia inhibitory factor</i>
LIFR	LIF-Rezeptor
M	
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
Min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Mx1-Cre	IFN α -induzierbare Cre Rekombinase

N

n.d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMRI	Naval Medical Research Institute

O

OSM	<i>oncostatinM</i>
OSMR	OSM-Rezeptor

P

PAS	<i>periodic acid Schiff reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pe	Phycoerythrin
PMA	Phorbol 12- Myristat 13-Azetat
PV	parasitophore Vakuole
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R

RIPA	<i>Radio Immuno Precipitation Assay</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR

S

s	Sekunde
SAG1	<i>surface antigene 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SH2	<i>src homology 2</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SHP2	<i>src-homology 2-containing protein-tyrosine phosphatase</i>
SOCS	Suppressor der Zytokinsignale

T

TAMRA	Tetramethylrhodamin
Tbl.	Tablette
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TE	<i>Toxoplasma-Enzephalitis</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle

TUNEL	<i>terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
TYK2	Tyrosinkinase 2
U	
U	Einheit
UNG	Uracil-N-Glykosylase
V	
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
W	
WSX-1	Teil des IL-27-Rezeptors
Y	
Y	Tyrosin
Z	
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii*

1.1.1 Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der durch sein extrem breites Wirtsspektrum, er kann alle warmblütigen Vertebraten inklusive des Menschen infizieren, zu einem der am weitesten verbreiteten Parasiten geworden ist.

Im Jahr 1908 wurde von Nicolle und Manceaux in Nordafrika ein bis dahin unbekanntes intrazelluläres Protozoon beschrieben (Nicolle und Manceaux, 1909). Seinen Namen, *Toxoplasma gondii*, erhielt es 1909 in Erinnerung an das Wirtstier aus dem es zuerst isoliert wurde, dem nordafrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gondii*, sowie in Anlehnung an seine gebogene Form (griechisch: toxon = Bogen; plasma = Form). Zeitgleich wurde der Parasit auch von Splendore in einem brasilianischen Kaninchen entdeckt (Splendore 1908). Zwischen 1909 und 1937 wurden *Toxoplasma*-artige Organismen in vielen verschiedenen Tierspezies und auch dem Menschen identifiziert. Aber erst 1937 konnten Sabin und Olitsky zeigen, dass *T. gondii* ein obligat intrazellulärer Parasit ist, der leicht durch intraperitoneale, intrakraniale oder subkutane Injektion von Hirnhomogenaten infizierter Tiere in Labortieren passagiert werden kann (Sabin and Olitsky, 1937). Weiterhin erkannten sie, dass auch frisches Fleisch infektiös ist. Erst 1970 konnte der Lebenszyklus von *T. gondii* mit der Entdeckung des Endwirtes, der Hauskatze oder anderen Mitgliedern der Familie *Felidae*, komplett aufgeklärt werden (Dubey et al., 1998; Frenkel et al., 1970; Lindsay et al., 1991).

Während seines Lebenszyklusses kann man bei *T. gondii* drei unterschiedliche Infektionsstadien unterscheiden:

- (i) die sich schnell asexuell vermehrenden Tachyzoiten,
- (ii) die sich langsam asexuell vermehrenden Bradyzoiten und
- (iii) die männlichen und weiblichen Gametozyten im Darm des Endwirtes, die nach ihrer sexuellen Vermehrung als Oozysten ausgeschieden werden.

Diese drei Stadien sind in einem komplexen Lebenszyklus miteinander verbunden, der schematisch in Abb. 1 dargestellt ist.

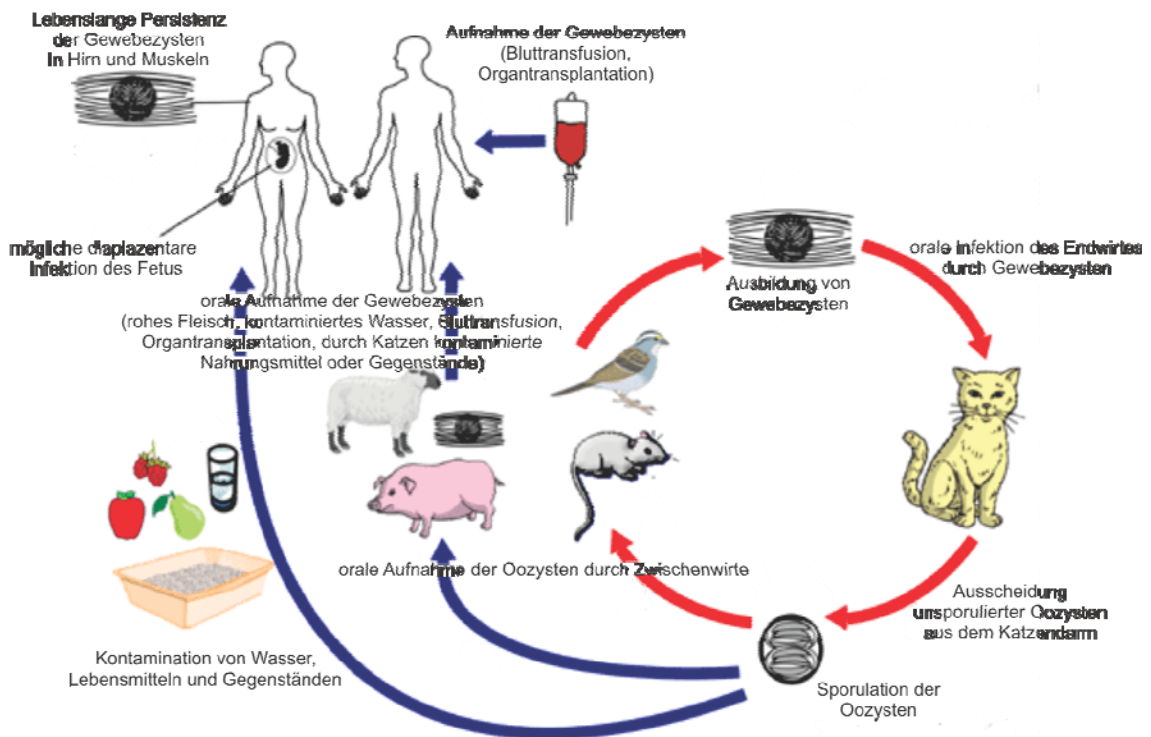


Abb. 1 Der Lebenszyklus von *T. gondii*

Der Lebenszyklus von *T. gondii* unterteilt sich in einen sexuellen und einen asexuellen Teil. Die sexuelle Vermehrung erfolgt in der intestinalen Phase im Endwirt, der Katze. Die asexuelle Vermehrung findet in den verschiedenen Zwischenwirten statt (modifiziert nach Centers for Disease Control & Prevention Center for for Global Health, Atlanta, USA).

Das von Frenkel als Tachyzoiten bezeichnete Stadium (griechisch tachos = schnell) beschreibt den sich schnell replizierenden Parasiten. Die Invasion in die Wirtszelle ist ein schneller, aktiver Prozess von 8 – 12 Sekunden Dauer und beginnt damit, dass der Parasit zunächst auf der Zelloberfläche entlang gleitet und helikale Rotationen ausführt. Nach dem initialen Kontakt durchdringt *T. gondii* die Zellmembran mit dem apikalen Ende (Dubremetz, 1998; Morisaki et al., 1995). Während der Invasion bildet sich die parasitophore Vakuole (PV) aus, in welcher der Parasit innerhalb der Wirtszelle repliziert. Diese parasitophore Vakuole besteht zum Großteil aus der Plasmamembran der Wirtszelle, die während der Invasion eingestülpt wird (Sibley et al., 1995), und aus der sämtliche Transmembranproteine entfernt werden (Mordue et al., 1999). Eine weitere interessante Eigenschaft der parasitophoren Vakuole ist neben dem Fehlen von Wirtszellproteinen ihre Unfähigkeit, mit den Lysosomen der Wirtszelle zu fusionieren. Dadurch wird eine Ansäuerung der Vakuole verhindert, die ansonsten zum Tod des Parasiten führen würde (Sibley et al., 1985). Innerhalb der PV vermehren sich die

Tachyzoiten ungeschlechtlich mittels Endodyogenie, bei der sich innerhalb der Mutterzelle zwei Tochterzellen bilden. Die durchschnittliche Generationsdauer beträgt fünf bis neun Stunden. Nach sieben bis acht Teilungen platzt die Wirtszelle auf und die freigesetzten Parasiten können neue Zellen infizieren. Um der Immunantwort zu entgehen, differenzieren sich die Tachyzoiten zu Bradyzoiten (griechisch brady = langsam) und die parasitophore Vakuole wird zu einer Zystenhülle umgebaut (Dubey et al., 1998). Die Bradyzoiten vermehren sich ebenfalls mittels Endodyogenie, allerdings sehr langsam. Sie stellen die chronische Dauerform des Parasiten dar und kommen vor allem intrazellulär in den Neuronen des zentralen Nervensystems, im Auge und im Muskelgewebe vor. Hier können sie während der gesamten Lebenszeit des Zwischenwirtes persistieren.

Die Infektion erfolgt meist über den oralen Weg durch Aufnahme von zystenhaltigem Fleisch oder Oozysten aus dem Katzenkot, wodurch die Parasiten auf weitere Zwischenwirte oder den Endwirt übertragen werden. Im Magen werden die Zysten oder Oozysten vom Magensaft aufgelöst und die Bradyzoiten freigesetzt. Im Darm infizieren diese dann die Epithelzellen und es erfolgt eine Rückdifferenzierung in Tachyzoiten. Da die Parasiten aktiv in Zellen eindringen können, sind sie in der Lage, die Lamina propria zu erreichen und dort Leukozyten zu infizieren. Diese Zellen werden dann mit dem Blutstrom durch den Körper transportiert und sorgen so für eine Ausbreitung des Parasiten in vielen Organsystemen, vor allem in Lunge, Leber, Lymphknoten, Muskeln und Gehirn (Dubey et al., 1998; Haroon et al., 2011; Frenkel, 1988). Durch das Einsetzen der spezifischen Immunantwort wird die weitere Ausbreitung des Parasiten verhindert und *T. gondii* wird in den meisten Organen, mit Ausnahme von Muskeln und Hirn, wieder eliminiert.

Im Endwirt des Parasiten, der Katze, erfolgt nach dem Übergang vom Bradyzoiten- zum Tachyzoitenstadium die intestinale sexuelle Vermehrung, die mit der Differenzierung der Tachyzoiten zu Gameten beginnt. Zwei Gameten verschmelzen dann zu einer Zygote, um die sich eine Oozystenwand bildet (Freyre et al., 1989). Diese unreifen Oozysten werden mit dem Kot ausgeschieden und im Freien erfolgt die Sporulation, bei der die infektiösen Oozysten entstehen, welche jeweils zwei Sporozysten mit je 4 Sporozoiten enthalten (Abb. 1). Die Oozysten können über längere Zeit – bei feuchter Umgebung sogar mehrere Jahre – im Freien überleben und neue Wirte infizieren (Ferguson et al., 1989).

Phylogenetisch betrachtet gehört *T. gondii* zur Gattung der *Apicomplexa*, die sich aus einzelligen, intrazellulär lebenden, teilweise ökonomisch wichtigen human- und tierpathogenen Parasiten zusammensetzt. Zu ihnen zählen neben den verschiedenen Plasmodienspezies, den Verursachern der Malaria, noch weitere humanpathogene

Erreger wie *Eimeria* und *Cryptosporidium*, sowie die tierpathogenen Apikomplexa *Neospora*, *Theileria* und *Sarcocystis*. Die Mitglieder dieser phylogenetischen Gattung zeichnen sich durch das Vorhandensein eines Apicalkomplexes, einem Komplex aus sekretorischen Organellen am apikalen Pol des Parasiten, der aus Mikronemen und Rhoptrien besteht, sowie einen zusätzlichen plastidähnlichen, nicht photosynthetischen Organell, dem Apicoplasten aus. In Europa und Nord-Amerika existieren von *T. gondii* Typ I-, Typ II- und Typ III- Stämme, sowie atypische Stämme, die Merkmale verschiedener Kombinationen der Typ-I, -II und -III Stämme zeigen. Die Zuordnung der Parasiten zu den verschiedenen klonalen Typen wird auf DNA-Ebene mittels Restriktions-Längen-Polymorphismus Analyse vorgenommen (Herrmann et al., 2010; Howe and Sibley, 1995). In Süd-Amerika und Asien sind die atypischen Stämme vorherrschend (Lehmann et al., 2006). Dominant in Mitteleuropa sind die Typ-II Genotypen. Die klonalen Typen von *T. gondii* sind in Mäusen unterschiedlich virulent. Während Infektionen mit Typ-I Stämmen in Mäusen letal verlaufen, sind Typ-II und Typ-III Stämme weit weniger virulent (Sibley and Boothroyd, 1992; Dubey et al., 2012).

1.1.2 Medizinische Bedeutung

Beim Menschen kann *T. gondii* das Krankheitsbild der Toxoplasmose auslösen. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu einem Drittel der Weltbevölkerung infiziert ist, wobei es allerdings gravierende lokale Unterschiede gibt (Pappas et al., 2009; Tenter et al., 2000). In Deutschland korreliert die Durchseuchungsrate mit dem Lebensalter, etwa 20% der 20-jährigen und circa 30% der 30-jährigen sind serologisch positiv (Gross, 1994).

Während der akuten Infektion treten bei immunkompetenten Menschen keine oder nur geringe Symptome, wie beispielsweise das Anschwellen der Lymphknoten und leichtes Fieber, auf (Luft and Remington, 1992). In der chronischen Phase der Infektion bilden sich Zysten in den Neuronen des Gehirns und in den Muskelzellen aus. Auch das Auge kann betroffen sein. Diese bradyzoitenhaltigen Zysten unterliegen der Kontrolle des Immunsystems und werden so an einer Reaktivierung gehindert. Daher bleibt bei Immunkompetenten die chronische Infektion des ZNS und der Muskulatur klinisch unauffällig. Eine Besonderheit ist die okuläre Toxoplasmose bei immunkompetenten Individuen. Hier werden während der postnatalen Erstinfektion auch Retina und Choroidea des Auges infiziert. Das Risiko, innerhalb eines Jahres eine Retinochoroiditis zu entwickeln liegt zwischen 0,3 und 3% (Pleyer et al., 2007). Diese rezidivierenden Entzündungen der Netz- und Aderhaut können zur Erblindung führen (Holland, 2004; Montoya and Liesenfeld, 2004).

In immunsupprimierten Patienten, beispielsweise bei HIV-Infizierten, bei medikamentöser Immunsuppression infolge einer Organtransplantation oder nach einer Chemotherapie, kann eine Reaktivierung der Toxoplasmose erfolgen, die in den meisten Fällen in eine *Toxoplasma*-Enzephalitis (TE) mündet. Die Zysten, die sich nach einer akuten Infektion im Gehirn gebildet haben und nun nicht mehr ausreichend vom Immunsystem kontrolliert sind, werden reaktiviert, wobei sich die Bradyzoiten wieder in Tachyzoiten differenzieren, die sich ungehindert ausbreiten und so zu einer nekrotisierenden Enzephalitis führen (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993;Luft and Remington, 1992;Luft et al., 1993).

Komplikationen können ebenfalls nach einer Erstinfektion während der Schwangerschaft auftreten, bei welcher der Parasit die Plazentaschranke überwinden und in den Blutkreislauf des Fötus gelangen kann. Dabei korreliert die Gefahr einer diaplazentaren Übertragung invers mit der Schwere der Symptome des Feten und ist im letzten Trimenon am höchsten (Montoya and Liesenfeld, 2004;Ho-Yen et al., 1992;Remington and Desmots, 1990). Je früher in der Entwicklung des Fötus eine Infektion erfolgt, desto schwerer sind die dabei entstehenden Folgen. Bei einer Infektion der Mutter in einem sehr frühen Stadium der Schwangerschaft kann sie zum Tod bzw. Abort des Kindes führen. Bei späterer Infektion variieren die Symptome der kongenitalen Toxoplasmose und umfassen Erkrankungen wie Hydrozephalus, intracraniale Kalzifikation, mentale Retardation und Epilepsie (Bowie et al., 1997;Tenter et al., 2000). Weiterhin kann sich *T. gondii* auf Grund einer konnatalen Infektion in der Retina eines Feten absiedeln und ebenfalls rezidivierende Retinochoroiditiden hervorrufen. Das Risiko, eine Retinochorioiditis aufgrund einer pränatalen Toxoplasmose zu entwickeln, beträgt bis zum 6. Lebensjahr 20%. Geht man davon aus, das eine pränatale Toxoplasmose etwa 1.000-mal seltener als eine postnatal erworbene Infektion ist, so sind die meisten *Toxoplasma*-Retinochorioiditiden das Resultat einer postnatal erworbenen Infektion. (Pleyer et al., 2007)

Die am häufigsten angewendete Therapie der Toxoplasmose ist eine Kombinationstherapie mit Pyrimethamin, Sulphadiazin und Folinsäure, die in den Folsäurestoffwechsel der Parasiten eingreift (Tenter et al., 2000). Alternativ kann eine Kombinationstherapie mit Pyrimethamin und Clindamycin zur Hemmung der Parasitenreplikation angewendet werden. Ein weiteres alternatives Medikament ist Atovaquon, ein Inhibitor des Zytochrom b in der mitochondrialen Atmungskette des Parasiten (Pfefferkorn et al., 1993). Andere wirksame Medikamente sind Spiramycin, Cotrimoxazol, Azithromycin oder Clarithromycin. Eine Indikation zur Behandlung besteht bei einer Primärinfektion von Schwangeren, der kongenitalen Toxoplasmose von Neugeborenen, einer aktiven Retinochoroiditis und einer reaktivierten zerebralen Toxoplasmose. Die akute, symptomlose oder weitgehend asymptomatische Infektion

Immunkompetenter ist in der Regel nicht behandlungsbedürftig (Montoya and Liesenfeld, 2004). Medikamente gegen die chronische Infektion durch Bradyzoiten sind nicht vorhanden.

1.2 Immunologie der Toxoplasmose

In der akuten Phase der Infektion werden Granulozyten als früheste phagozytierende Zellen zum Darmepithel rekrutiert. Ein weiterer wichtiger Zelltyp in der frühen Immunantwort sind dendritische Zellen. Beide Zelltypen produzieren Interleukin (IL)-12, ein essentielles Zytokin der Immunantwort, welches die Produktion von Interferon (IFN)- γ , dem wichtigsten Zytokin zur Kontrolle der Infektion, anregt. Zusätzlich werden inflammatorische Monozyten in der frühen Phase der oralen Infektion zur Lamina Propria rekrutiert und spielen dort, zusammen mit natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) eine wichtige Rolle bei der Erregerabwehr in der Darmmukosa (Dunay et al., 2010). Die Zytotoxizität der NK-Zellen wird durch Ausschüttung von IL-18 aus Makrophagen und dendritischen Zellen erhöht. Gleichzeitig produzieren NK-Zellen ebenfalls IFN- γ , welches Makrophagen aktiviert und die Expression von *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II verstärkt. Eine direkte Interaktion zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen verstärkt wechselseitig die Produktion von IFN- γ bzw. IL-12 (Guan et al., 2007). Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Verbreitung des Parasiten im Körper, da sie bevorzugt von *T. gondii* infiziert werden (Channon et al., 2000), was eine Hypermotilität der Zellen bewirkt (Lambert et al., 2006). Auf diese Weise werden die Parasiten über den Blutstrom im Körper verteilt. Um in das Gehirn zu gelangen, muss *T. gondii* die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden. Unter inflammatorischen Bedingungen exprimieren die Endothelzellen die Zell-Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule* (VCAM), *intercellular adhesion molecule* (ICAM) und Selektin (Coisne et al., 2006; Deckert et al., 2003; Kadl and Leitinger, 2005). Die BHS wird durchlässiger, so dass Makrophagen/Monozyten, T- und B-Zellen, sowie dendritische Zellen (DCs) in das Gehirn migrieren können (Courret et al., 2006; Pober and Sessa, 2007; Ransohoff et al., 2003).

Die Kontrolle der intrazerebralen Parasiten ist vor allem von der lokalen IFN- γ Produktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen abhängig, aber auch von B-Zellen (Gazzinelli et al., 1992). CD4⁺ T-Zellen haben eine immunmodulatorische Funktion (Gazzinelli et al., 1991), sie entwickeln sich zu Th1-Zellen, welche IFN- γ und IL-2 produzieren und so zur Proliferation der CD8⁺ T-Zellen beitragen. Auch sezernierte *T. gondii* Antigene stimulieren die Bildung CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen. So erkennen CD8⁺ T-Zellen insbesondere von Tachyzoiten sezernierte Antigene (Kwok et al., 2003).

Das von den T-Zellen sezernierte IFN- γ induziert die Synthese toxoplasmazidal wirkender Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO), das durch die induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS) generiert wird und das Wachstum der Parasiten verhindert. Weiterhin stimuliert IFN- γ die Produktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welche das für die Parasiten wichtige Tryptophan abbaut. IFN- γ induziert die Synthese proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , IL-6 und IL-1 (Lu et al., 2004; Suzuki et al., 1997). Die sehr starke Th1 Immunantwort wird durch IL-10, Lipoxin A4 und IL-27 wieder herunter reguliert. Diese Immunsuppression ist notwendig, um eine Immunpathologie zu verhindern (Aliberti et al., 2002; Gazzinelli et al., 1996; Hunter et al., 2004; Suzuki et al., 2000). Weitere wichtige protektive Mediatoren der Immunantwort in der *T. gondii* Infektion sind die regulatorischen T-Zellen (Tregs) (Tenorio et al., 2011), welche eine überschießende Immunantwort der T-Zellen IL-2 abhängig verhindern.

Im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* werden auch die Zytokine der IL-6 Familie induziert und tragen zum subklinischen Verlauf der Erkrankung bei. Der Verlust von IL-6 führt bei Mäusen zu einer unkontrollierten Vermehrung der Parasiten im Gehirn, einer hierdurch hervorgerufenen schweren TE und letztendlich zum Tod des Tieres (Suzuki et al., 1997; Jebbari et al., 1998). Mäuse, bei denen IL-27, ein Zytokin der IL-6 Familie, aufgrund eines Defektes des IL-27 Rezeptors keine Wirkung entfalten kann, können die Replikation der Parasiten erfolgreich hemmen, sind jedoch nicht in der Lage, die Entzündungsreaktion einzudämmen und sterben an einer überschießenden T-Zell-Antwort, welche durch eine stark erhöhte IFN- γ - und IL-2-Expression charakterisiert ist (Villarino et al., 2003; Villarino et al., 2006). Weitere Untersuchungen deckten auf, dass IL-27 auch dafür verantwortlich ist, die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 einzudämmen (Passos et al., 2010; Stumhofer et al., 2006).

Neben T-Zellen sind auch hirneigene Zellen wie Mikroglia und Astrozyten an der intrazerebralen Immunantwort beteiligt. Mikroglia, die hirnansässige Makrophagenpopulation, reagiert schnell auf eine intrazerebrale Infektion mit *T. gondii*. Mikrogliazellen interagieren mit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und werden durch von T-Zellen sezerniertes IFN- γ aktiviert. IFN- γ aktivierte Mikrogliazellen produzieren über eine verstärkte Expression von iNOS NO. *In vivo* stimuliert IFN- γ im infizierten Gehirn die Produktion von TNF- α in Mikrogliazellen, was die NO-Produktion durch Mikrogliazellen ebenfalls verstärkt (Deckert-Schluter et al., 1999). Auch die Stimulation der Mikroglia mit dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) oder *transforming growth factor* (TGF)- β in Kombination mit IFN- γ induzieren die NO-Synthese (Chao et al., 1993; Deckert-Schluter et al., 1995; Fischer et al., 1993). Im Gegensatz dazu verringern *T. gondii*-infizierte Mikrogliazellen die NO-

Produktion TGF- β 1-abhängig und verhindern so eine Neuronenschädigung (Rozenfeld et al., 2005). Infizierte Mikrogliazellen zeigen im Gegensatz zu infizierten Astrozyten eine erhöhte Motilität (Dellacasa-Lindberg et al., 2011).

Astrozyten werden durch IFN- γ und IL-1 β aktiviert und produzieren als Antwort auf die Infektion IL-6, IL-1, TNF- α , GM-CSF (Peterson et al., 1995), *C-X-C motif chemokine-10* (CXCL-10) und *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) (Brenier-Pinchart et al., 2004; Strack et al., 2002). Insbesondere die astrozytäre CXCL-10-Synthese ist von großer funktioneller Bedeutung, da CXCL-10 essentiell für die Rekrutierung protektiver Leukozyten in *T. gondii* infizierte Organe ist. Auf die Stimulation mit IFN- γ reagieren Astrozyten mit einer Erhöhung der Synthese der p47 GTPase IFN- γ induzierten Kinase (IGTP) (Halonen et al., 2001). An den Vakuolen der infizierten Zellen akkumulieren verschiedene p47 GTPasen wie IIGP1 oder IGTP, was einerseits die IFN- γ -vermittelte Parasitenabwehr unterstützt und andererseits eine Ruptur der Vakuole und nachfolgend den Tod der Parasiten induziert (Martens et al., 2005; Melzer et al., 2008; Taylor et al., 2004). Eine der ersten Reaktionen im infizierten Hirn, die um den 10. Tag nach der Infektion, noch bevor Zysten detektierbar sind, stattfindet, ist die Aktivierung der Astrozyten (Hunter et al., 1992). Es entwickelt sich eine Astroglie, die durch einen schnellen GFAP-Anstieg, eine Hypertrophy und einen veränderten Metabolismus der Zellen gekennzeichnet ist (Liberto et al., 2004; Nolte et al., 2001; Tabernero et al., 2006). So umschließen hypertrophe, stark *glial fibrillary acidic protein* (GFAP)-positive Astrozyten die parasitenassoziierten Läsionen (Astroglie). GFAP-defiziente Astrozyten sind nicht mehr in der Lage, die entzündeten Bereiche zu umschließen und so die Größe der Entzündungsherde zu beschränken (Stenzel et al., 2004).

Im Gegensatz zu Astrozyten und Mikroglia ist die immunologische Funktion der Neuronen in der TE größtenteils unbekannt. *In vitro* Untersuchungen legen nahe, dass Neuronen nicht ausschließlich als Zielzellen für *T. gondii* fungieren, sondern auch zur intrazerebralen Immunantwort beitragen. So produzieren kultivierte, IFN- γ stimulierte, *T. gondii* infizierte zerebelläre Neuronen verstärkt IL-6, TGF- β 1, sowie die Chemokine *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α und MIP-1 β (Schluter et al., 2001).

1.3 Mausmodelle der Toxoplasmose

Zum Studium der Toxoplasmose hat sich das murine Modell bewährt, da es wesentliche Aspekte der humanen Erkrankungen rekapituliert und Mäuse verschiedenster genetischer Hintergründe und Suszeptibilitäten existieren. Hinzu kommt, dass die Infektion der Versuchstiere sehr einfach ist und die Parasiten unproblematisch in der

Zellkultur zu züchten sind. Im Mausmodell können verschiedenste Formen der *Toxoplasma*-Infektion simuliert werden, wie die kongenitale und okuläre Toxoplasmose, sowie die akute und chronische TE. Letztere wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Ebenso ermöglicht die Verwendung von gentechnisch veränderten Mäusen die einmalige Möglichkeit, *in vivo* die Funktion einzelner Gene bis auf Ebene einzelner Zellpopulationen zu untersuchen.

1.4 Die Zytokine der IL-6 Familie und der gp130 Signalweg

1.4.1 Die Zytokine der IL-6 Familie

Die Zytokine der IL-6-Familie, die IL-6, IL-11, IL-27, *leucemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatinM* (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin-1* (CT-1) und *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) umfassen, gehören zu den Typ-I Zytokinen, welche vier α -helikale Strukturen aufweisen (Bazan, 1991). IL-6 Zytokine sind eine wichtige Gruppe von Mediatoren, die an der Regulation von Entzündungsreaktionen, Immunantwort, Hämatopoese, Regeneration, Embryonalentwicklung und Fertilität beteiligt sind (Heinrich et al., 2003). Bei der TE sind vor allem IL-6 und IL-27 wichtig für die Kontrolle der Erkrankung (Silver et al., 2011; Stumhofer et al., 2006; Suzuki et al., 1997). Die Wirkung der übrigen IL-6 Zytokine bei der TE ist bislang unklar.

IL-6 wurde 1986 von Kishimoto und Hirano als B-Zell-stimulierender Faktor entdeckt, der die IgG-Produktion stimuliert (Kishimoto et al., 1987). Heute weiß man, dass IL-6 ein pleiotropes Zytokin ist, das viele verschiedene biologische Funktionen bei der Immunregulation, Zellreifung und -differenzierung, Hämatopoese, Entzündung, Wundheilung, dem Knochenmetabolismus und der Onkogenese, sowie als Wachstumsfaktor ausübt (Kishimoto, 2006). Es wird bei praktisch allen parasitären, viralen und bakteriellen Infektionen und Verletzungen von unterschiedlichen Zelltypen, wie Makrophagen, Monozyten, Astrozyten, Mikroglia, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, B- und T-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, vaskulären, glatten Muskelzellen, Osteoblasten und intestinalen Epithelzellen sezerniert (Naka et al., 2002). Dabei dienen neben Zytokinen auch Bestandteile der Erreger, wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide als IL-6-Induktoren. Zu den physiologischen Stimulatoren der IL-6 Produktion gehören, abhängig vom Zelltyp, unter anderem IL-1, TNF, OSM, IFN- γ und IL-17. IL-6 kann sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken. Es ist der wichtigste Mediator bei der Induktion der Genexpression der Akut-Phase-Proteine und führt zur Differenzierung von B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen (Heinrich et al., 1990).

IL-11 wurde erstmals im Zellkulturüberstand der Stromazelllinie PU-34 als Hämatopoese-stimulierender Faktor (Paul et al., 1990) und in einer Adipozyten-Zelllinie als Inhibitor der Adipozytenentwicklung beschrieben (Ohsumi et al., 1991). Das Zytokin beeinflusst die Immunantwort positiv, moduliert antigenspezifische Antikörperreaktionen und stimuliert die T-Zell abhängige Entwicklung von IgG sezernierenden B-Zellen.

Funktionelles IL-27 ist ein Heterodimer aus dem helikalen Protein IL-27p28 und der Untereinheit *Epstein-Barr virus induced gene 3* (EBI3), die eine lösliche, rezeptorartige Komponente darstellt. IL-27 ist ein frühes Produkt aktivierter antigenpräsentierender Zellen, verursacht die Expansion naiver CD4⁺ T-Zellen und stimuliert deren IFN- γ -Produktion. Es wurde gezeigt, dass IL-27 tumorinhibierende Aktivität induzieren (Hisada et al., 2004), Entzündungsreaktionen eindämmen (Wirtz et al., 2006) und die Entwicklung pathogener IL-17 produzierender CD4⁺ T-Zellen negativ regulieren kann (Diveu et al., 2009; Liu and Rohowsky-Kochan, 2011; Stumhofer et al., 2006).

Die Aktivität von LIF wurde erstmals 1969 von Ichikawa in embryokonditioniertem Medium beschrieben (Ichikawa, 1969). Heute weiß man, dass LIF von verschiedensten weiteren Zellen, wie Makrophagen, Endothelzellen und Astrozyten sezerniert wird (Aloisi et al., 1994; Jasper et al., 2011). *In vivo* ist der LIF-Signalweg mit Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen assoziiert (Butzkueven et al., 2002; Kerr and Patterson, 2004; Slaets et al., 2010). Ein Verlust von LIF führt in Mäusen zu einer verkürzten Lebenszeit hämatopoetischer Stammzellen, zum Verlust von Motorneuronen und Gliazellen, einer veränderten Funktion der Oligodendrozyten und einer gestörten Reifung olfaktorischer Neurone (Bugga et al., 1998; Escary et al., 1993; Holtmann et al., 2005). Eine wichtige Aufgabe von LIF scheint auch in der Implantation der befruchteten Eizelle zu liegen. Weibliche LIF-defiziente Mäuse sind fertil, jedoch kann sich die Blastozyste nicht einnisten (Trouillas et al., 2009).

OSM wurde erstmals 1986 im Überstand der Monozyten-Zelllinie U937 nachgewiesen (Zarling et al., 1986). Auch aktivierte T-Zellen sind eine wichtige Quelle für OSM (Malik et al., 1989). Im Gehirn wird das Zytokin vor allem von Mikrogliazellen produziert (Repovic and Benveniste, 2002). Erhöhte OSM-Werte wurden in ZNS-Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose, HIV-assoziiierter Demenz und Epilepsie beschrieben (Ensoli et al., 1999; Jankowsky and Patterson, 1999; Wallace et al., 1999). Weiterhin senkt OSM die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-vermittelte Zytotoxizität und wirkt schützend auf Neuronen (Weiss et al., 2006).

CNTF wurde bereits 1979 in Zellkulturen von Ziliarganglien des Huhnes nachgewiesen, wo es zum Überleben der Nervenzellen beiträgt (Varon et al., 1979). Eine Aktivierung der Signaltransduktion über den CNTF-Rezeptor beeinflusst das Überleben, die

Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Neuronen, Gliazellen und verschiedensten weiteren Zelltypen (Vlotides et al., 2004).

Das 1999 identifizierte Zytokin CLC (Senaldi et al., 1999; Shi et al., 1999) ist essentiell für die Ausbildung der Motorneuronen während der Embryonalentwicklung (Zou et al., 2009) und die Bildung von Astrozyten aus fetalen Neuroepithelzellen (Uemura et al., 2002a). CLC übt starke proliferatorische Effekte auf B-Zellen aus und stimuliert die Produktion von IgM, IgG und IgA in murinen B-Zellen (Senaldi et al., 2002).

CT-1 wurde 1995 durch cDNA screening identifiziert (Pennica et al., 1995), nachdem 1993 nachgewiesen wurde, dass der Überstand embryonaler Stammzellkulturen ein hypertrophes Wachstum neonataler Herzmuskelzellen auslöst (Miller-Hance et al., 1993). In Mäusen beginnt die Expression von CT-1 am 8. Embryonaltag in den Herzmuskelzellen, während es in anderen Organen und Geweben erst in späteren Stadien der Embryonalentwicklung detektiert werden kann. Die Expression bleibt jedoch im Herzen am höchsten, was auch mit der Beobachtung korreliert, dass ein Verlust der CT-1 Produktion *in utero* zu hypoplastischen Herzschädigungen und zum Tod des Embryos führt. Die Inaktivierung des CT-1 vermittelten Signalweges nach der Geburt verursacht schwere Defekte am Herzen und anderen Systemen (Latchman, 1999).

1.4.2 Die Rezeptoren der IL-6 Zytokinfamilie

Die Zytokine der IL-6 Familie binden an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen. Diese Rezeptoren gehören zu den Typ-I-Membranproteinen, die durch einen extrazellulären N-Terminus, eine einzelne Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen C-Terminus gekennzeichnet sind. Eine Ausnahme bildet der CNTF Rezeptor, der mit der Plasmamembran durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker verbunden ist. Die Rezeptoruntereinheit gp130 ist gemeinsamer Bestandteil aller Rezeptorkomplexe der IL-6 Zytokine. Aus diesem Grund überschneiden sich die biologischen Wirkungen der verschiedenen IL-6 Zytokine, was seinen Ausdruck in der Tatsache findet, dass Mäuse, denen nur ein Zytokin fehlt, weniger gravierende Phänotypen ausbilden, als es die Wirkungen der einzelnen Zytokine vermuten lassen würden (Betz et al., 1998). Unterschiede werden jedoch durch die Bindung der Zytokine an ihre spezifischen α -Untereinheiten und/oder durch die zusätzliche Rekrutierung der spezifischen β -Rezeptorketten vermittelt. Die Signaltransduktion der IL-6-Zytokine erfolgt über einen komplexen Mechanismus in mehreren Schritten. IL-6, IL-11, CNTF und CLC binden zunächst an ihre spezifische nichtsignalisierende α -Untereinheit. So bindet z.B. IL-6 an den IL-6 Rezeptor (IL-6R), die α -Untereinheit des IL-6 Rezeptorkomplexes. Im Folgenden wird an diesen Komplex ein gp130-Homodimer

angelagert. Für LIF, CT-1, und OSM existieren keine α -Untereinheiten. LIF und CT-1 binden zunächst an den LIF-Rezeptor (LIFR). Nach erfolgter Zytokin-Rezeptor Bindung wird gp130, die β -Rezeptoruntereinheit aller Zytokine der IL-6 Familie, an den Komplex angelagert. OSM bildet eine Ausnahme, da es erst an gp130 bindet und dann im Folgenden im humanen System einen LIFR oder OncostatinM-Rezeptor (OSMR) an diesen Komplex anlagert (Abb. 2). Murines OSM kann hingegen nur das Rezeptorheterodimer aus gp130 und OSMR nutzen (Jones et al., 2011; Sims and Walsh, 2010).

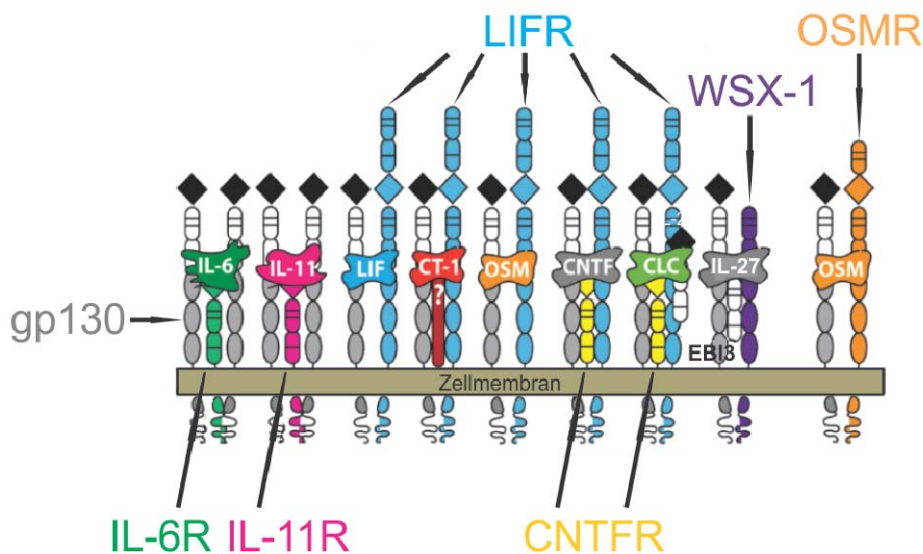


Abb. 2 Die Rezeptoren der IL-6 Familie

Die spezifische Bindung der verschiedenen Zytokine der IL-6 Familie erfolgt über die jeweiligen α -Untereinheiten des Rezeptorkomplexes (IL-6R, IL-11R, CNTFR). Die β -Rezeptoruntereinheit gp130 ist Bestandteil jedes Rezeptorkomplexes der Zytokine der IL-6 Familie (jeweils grau dargestellt). Gp130 bildet Homodimere oder Heterodimere mit den anderen β -Untereinheiten LIFR, WSX-1 oder OSMR (modifiziert nach Sims und Walsh 2010).

1.4.3 Die Rezeptoruntereinheit gp130 und der gp130-vermittelte Signalweg

Das gp130 Molekül ist ein 918 Aminosäuren umfassendes Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 130 Kilodalton (kDa), wobei die zytoplasmatische Domäne aus 277 Aminosäuren, die Transmembrandomäne aus 22 Aminosäuren und die extrazelluläre Domäne aus 619 Aminosäuren besteht. Der extrazelluläre, N-terminale Anteil setzt sich aus einer immunglobulinartigen Domäne D1 und 5 Fibronectin Domänen vom Typ III zusammen (D2 bis D6). Der intrazelluläre Teil des gp130 Moleküls verfügt über konservierte Motive zur Assoziation mit Januskinasen (Jak), sowie 6 Tyrosinreste (Abb. 3A).

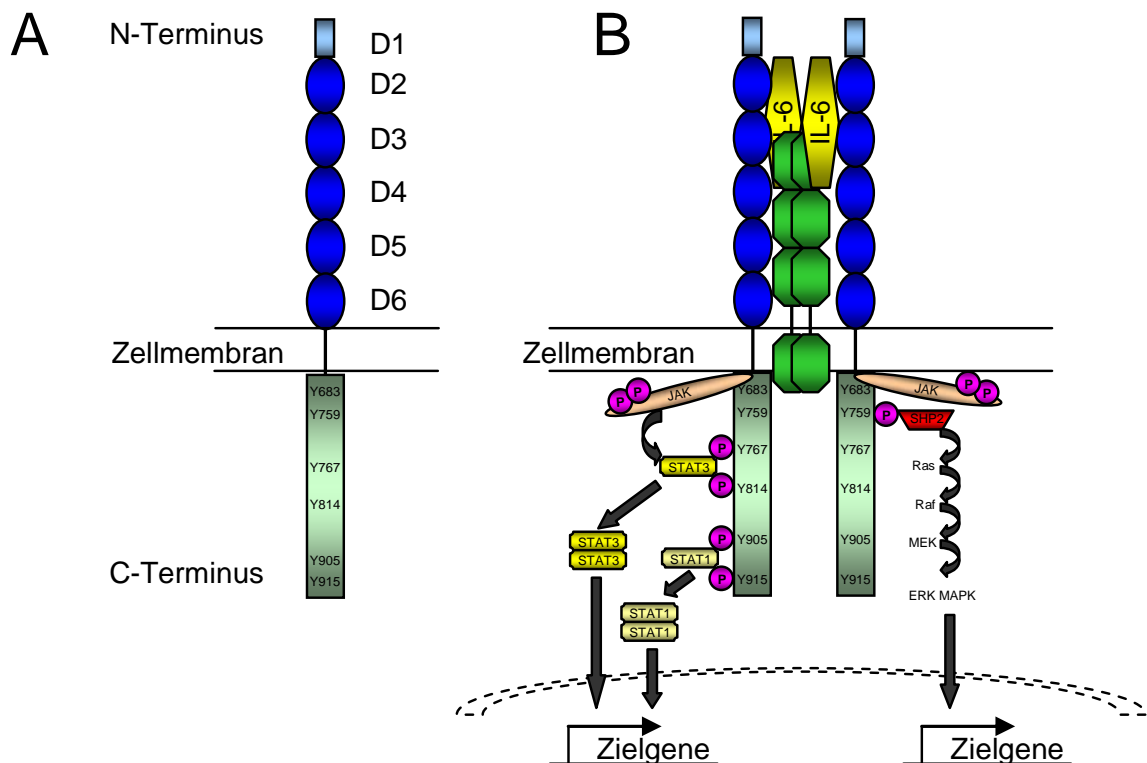


Abb. 3 Die gp130-vermittelten Signalwege

A Der gp130-Rezeptor besteht aus 6 extrazellulären Domänen D1 bis D6, wobei D1 eine IgG-ähnliche Domäne ist und D2 bis D6 Fibronectin-Domänen sind. Dem extrazellulären Teil schließt sich eine Transmembrandomäne an. Die 6 Tyrosinreste (Y) der intrazellulären Domäne dienen als Bindungsstellen für STAT-Moleküle und SHP2. **B** Nach der zytokininduzierten Zusammenlagerung des Zytokin-Rezeptor-Komplexes werden Januskinasen (JAK) aktiviert und die Tyrosinreste des gp130-Moleküls phosphoryliert. Daraufhin werden STAT-Moleküle phosphoryliert, die daraufhin dimerisieren, in den Zellkern translozieren und Zielgene regulieren. Ein weiterer Signalweg verläuft über eine Kaskade von Serin/Threonin-Kinasen, die initial durch SHP2 und Ras aktiviert werden (modifiziert nach (Kristiansen and Mandrup-Poulsen, 2005)).

Durch die Bindung eines Zytokins an den nichtsignalisierenden α -Rezeptor entsteht eine Bindungsstelle, die mit der ersten β -Untereinheit des Rezeptors (gp130, LIFR, WSX-1 oder OSMR) interagiert. Die folgende Interaktion des Zytokins mit der D1-Domäne der gp130-Untereinheit bildet einen Signalkomplex. Zwei solcher Trimere bilden einen kompetenten Rezeptorkomplex (Boulanger et al., 2003; Chow et al., 2002; Xu et al., 2010). Im Folgenden werden die Januskinasen JAK1, JAK2 und TYK2 aktiviert, ein Vorgang, der zur Phosphorylierung der Tyrosinreste Y767, Y814, Y905 und Y915 beim Menschen, bzw. Y765, Y812, Y904 und Y914 bei der Maus führt. Diese Phosphorylierungen generieren Rekrutierungsstellen für Proteine mit SH2 (src homology 2) Domänen wie den Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Das an die Phosphotyrosinmotive gebundene STAT3 wird hierdurch ebenfalls tyrosinphosphoryliert, dimerisiert und transloziert in den Zellkern. Dimerisiertes STAT3 bindet an bestimmte *enhancer* Sequenzen und verändert hierdurch das Muster der Geninduktion (Yu et al., 2009). Durch die Phosphorylierung des Y759 beim Menschen bzw. Y757 bei der Maus wird die SH2 Domäne der

Tyrosinphosphatase-2 (SHP-2) gebunden und die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK) aktiviert (Abb. 3B). Gleichmaßen wichtig ist diese Tyrosinphosphorylierung für die Bindung des Suppressors der Zytokinsignale (SOCS), der einen inhibierenden Rückkopplungsweg darstellt und das Zytokinsignal beendet (Babon et al., 2012).

Neben den membrangebundenen α -Rezeptoren existieren auch lösliche Formen, die proteolytisch oder durch Translation alternativ gespleißter mRNA entstehen. Der lösliche IL-6-Rezeptorkomplex besteht aus jeweils zwei Molekülen IL-6, welche an den löslichen IL-6-Rezeptor α (IL-6R α) mit gleicher Affinität wie an den membrangebundenen Rezeptor binden. Diese Bindung ist Voraussetzung für die folgende Anlagerung des Komplexes an gp130, während ungebundenes IL-6 nicht an gp130 bindet. Das Vorhandensein löslicher IL-6-Rezeptoren eröffnet Zellen, welche keine membranständige IL-6R α -Untereinheit exprimieren, durch den beschriebenen Trans-Signalweg die Möglichkeit, ebenfalls auf IL-6 zu reagieren (Jones et al., 2005). Des Weiteren werden IL-6 Rezeptor exprimierende Zellen weiter für IL-6 Signale sensibilisiert (Scheller and Rose-John, 2006). Somit wirkt der lösliche IL-6R α agonistisch in der Zellaktivierung, während viele andere lösliche Rezeptoren die Bindung des Zytokins an den membranständigen Rezeptor verhindern und antagonistisch wirken.

Neben der löslichen Form des IL-6 Rezeptors existiert auch eine lösliche Form des gp130 Rezeptors. Dieser bindet selektiv an den Komplex aus löslichem IL-6 Rezeptor α und IL-6, während der Signalweg über den membranständigen IL-6 Rezeptor unbeeinflusst bleibt. Auf diese Weise wird die agonistische Wirkung des Trans-Signalweges blockiert und eine unkontrollierte Stimulation der Zellen verhindert (Jostock et al., 2001).

1.5 Geninaktivierung in konditionalen knockout Mausmodellen

1.5.1 Konstitutive Inaktivierung des gp130 Gens

Wird gp130 konstitutiv in allen Zellen deletiert, sterben die Mäuse bereits embryonal zwischen Tag 12,5 *post coitum* und dem Tag der Geburt. Histologische Untersuchungen zeigten kardiale, knöcherne und hämatopoetische Defekte (Kawasaki et al., 1997; Yoshida et al., 1996a).

1.5.2 Zelltypspezifische Inaktivierung des gp130 Gens

Auf Grund der Letalität konventioneller gp130 defizienter Mäuse können zur Erforschung gp130-abhängiger Prozesse nur Mäuse mit einer konditionalen Deletion von gp130 verwendet werden. Eine zelltypspezifische Deletion eines Gens kann mit Hilfe des cre/lox-Systems erzeugt werden. Hierbei ist ein Teil des interessierenden Gens durch artifiziell in das Genom eingebrachte *loxP* Schnittstellen flankiert. Die Sequenz besteht aus 34 Basenpaaren (bp), wobei 8 asymmetrische Basenpaare von palindromischen 13 bp langen Sequenzen flankiert werden. Diese Schnittstellen werden von der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 erkannt. Die 343 bp lange Sequenz, welche diese Rekombinase codiert, ist ebenfalls artifiziell in das Genom eines Wildtyp-Mausstammes eingebracht und wird unter Kontrolle eines spezifischen Promotors gestellt. Dabei ist zwischen induzierbaren und/oder zelltypspezifischen Promotoren zu unterscheiden. Wird ein Promotor nur durch die Anwesenheit eines bestimmten Proteins oder einer Substanz wie z.B. einem Zytokin oder Antibiotikum aktiv, ist er induzierbar, wie z.B. der Mx1-Promotor, der durch IFN α aktiviert wird. Injiziert man Mäusen, die ein gefloxtes Gen und das Mx1-Cre Transgen besitzen, IFN α , so wird der Promotor aktiviert und das gefloxtes Genfragment deletiert. Die bei Betz *et al.* verwendeten Mx1-Cre gp130^{fl/fl} Tiere zeigten eine Deletionseffizienz von bis zu 70% in Abhängigkeit vom Zelltyp (Betz *et al.*, 1998). Zelltypspezifische Promotoren, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind nur in einer bestimmten Zellpopulation des Körpers aktiv. Beispiele hierfür sind CD19-Cre transgene Tiere, die eine Deletion in B-Zellen bewirken (Hovelmeyer *et al.*, 2011) oder die hier verwendeten hGFAP-Cre und Synapsin I-Cre Mäuse, die *loxP* flankierte Genabschnitte in Astrozyten bzw. Neuronen deletieren. Während Synapsin I-Cre ein *loxP* flankiertes Gen selektiv in fast allen Neuronen des gesamten zentralen Nervensystems deletiert (Zhu *et al.*, 2001), ist GFAP während der frühen Embryogenese in Vorläuferzellen aktiv, die sich entweder zu Neuronen oder zu Astrozyten differenzieren. Aus diesem Grund ist ein Teil der Neuronen ebenfalls von der Rekombination betroffen (Malatesta *et al.*, 2003). Das Ausmaß der Gendeletion ist dabei vom Zeitpunkt der Cre-Expression während der Embryonalentwicklung abhängig. Je später Cre exprimiert wird, umso geringer ist die Gendeletion in Neuronen. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten hGFAP-Cre Stamm, der freundlicherweise von David H. Gutmann (St. Louis, USA) zur Verfügung gestellt wurde, ist die Cre-Rekombinase erst ab E14,5 aktiv, so dass eine weitestgehend Astrozyten-spezifische Deletion auftritt (Bajenaru *et al.*, 2002).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Die Persistenz von *T. gondii* im Gehirn ist für den Parasiten extrem wichtig. Als obligat intrazellulärer Parasit bildet *T. gondii* im Gehirn Zysten in Neuronen aus. Die Immunabwehr erfolgt hauptsächlich durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und kontrolliert die Infektion lebenslang. Zusätzlich sind auch hirnsässige Zellen wie Astrozyten und Neuronen an der Erregerabwehr beteiligt. Die Funktion der Astrozyten (Contreras-Ochoa et al., 2012; Stenzel et al., 2004; Suzuki et al., 2011; Wilson and Hunter, 2004) und Neuronen (Luder et al., 1999; Schluter et al., 2001) bei der TE wurde bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht, so dass ihre, insbesondere immunologische, Funktion zur Kontrolle der TE weitgehend unklar ist. Essentiell zur Kontrolle von *T. gondii* sind neben IFN- γ und TNF- α ebenfalls Zytokine der IL-6 Familie (Jebbari et al., 1998; Suzuki et al., 1997; Stumhofer et al., 2006).

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen tieferen Einblick in die Funktionen der Astrozyten und Neuronen in der TE zu erhalten. Dazu wurde die gemeinsame signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit der IL-6 Zytokine, gp130, in diesen Zellen deletiert und der Verlauf der Infektion *in vivo* und *in vitro* analysiert. Die zu beantwortenden Fragestellungen lauteten:

1. Welchen Einfluss hat astrozytär bzw. neuronal exprimiertes gp130 auf den Krankheitsverlauf?
2. Welche Veränderungen in der zerebralen Immunabwehr bewirkt der Verlust von gp130 in Astrozyten oder Neuronen?
3. Wie wirkt sich der Verlust von gp130 in Astrozyten und Neuronen auf die *T. gondii* Infektion dieser Zellen aus?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien für tierexperimentelle Arbeiten

Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Einbettmedium (Tissue Tek® O.C.T. TM Compound)	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande)
2- Methylbutan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4% Paraformaldehydlösung (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Zellkulturarbeiten

Sämtliche Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilbank. Die sterilen Zellkulturmedien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C angewärmt. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ und 60% Wasserdampfsättigung kultiviert. Die verwendeten Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Greiner-Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Hank's	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
HFF- Kultivierungsmedium	DMEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 10% Fötale Kälberserum (FKS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 100U/ml Penicillin/ Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
Astrozytenmedium I	DMEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 20% FKS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 2mM L-Alanin-L-Glutamin, 20µg/ml Gentamicin (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Astrozytenmedium II	DMEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 10% FKS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 2mM L-Alanin-L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 20µg/ml Gentamicin (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Neuronen-Kultivierungsmedium	Neurobasal (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 2% B27 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 500µM L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypsin-Inhibitor/DNase-Lösung:	Trypsin Inhibitor (0,52mg/ml) Sigma, Taufkirchen, Deutschland, DNase I (0,04mg/ml) Sigma, Taufkirchen, Deutschland, BSA (3mg/ml) Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Einfriermedium	90% FKS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland)

2.1.3 Material für biochemische Arbeiten

Ethanol unvergällt (70%, 98%)	Apotheke des Universitätsklinikums Magdeburg
Chloroform	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
easyDNA Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

Tabelle 1 Genotypisierungsprimer

Gen		Primersequenz (5'→3')	Amplifikatgröße	Referenz
hGFAP-Cre	sense	gac acc aga cca act ggt aat ggt agc gac	850 bp	(Surace et al., 2006)
	antisense	gca tcg agc tgg gta ata agc gtt ggc aat		
Synapsin I-Cre	sense	cca gca cca aag ggc gg	450 bp	Jamey D. Marth Labor, San Diego, USA
	antisense	tgc atc gac cgg taa tgc ag		
gp130	sense	tgg ctt gag cct cag ctt ggc tag	WT-Allel: 400 bp <i>loxP</i> -flankiertes Allel: 340 bp	(Sodenkamp et al., 2011)
	antisense	gtg aac agt cac cat gta cat ctg tac gc		
gp130 deletions-spezifisch	sense	tgg ctt gag cct cag ctt ggc tag	400 bp	
	antisense	caa att aat tca gaa tga att aca gat gct aga gc		

Tabelle 2 Primer für die HPRT-Kontroll-PCR

HPRT cDNA s	5'-GCT GGT GAA AAG GAC-3'
HPRT cDNA as	5'-CCA GTT TCA CTA ATG-3'
PCR Buffer, 10x	Qiagen, Hilden, Deutschland
HotStar Taq	Qiagen, Hilden, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Oligo-dT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

dNTP	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
steriles Aqua dest	Berlin Chemie AG, Berlin, Deutschland
Taqman® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Taqman® Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3 Primer für real-time PCR

Gen		Primersequenz (5' → 3')	Referenz
TgB1	sense	5'-gga act gca tcc gtt cat gag-3'	(Jones et al., 2000)
	antisense	5'-tct tta aag cgt tcg tgg tc-3'	
	Sonde	5'- FAM-cct ctg ctg gcg aaa agt gaa att cat – TAMRA-3'	
529 bp Fragment	sense	5'-aga gac acc gga atg cga tct-3'	(Patrat-Delon et al., 2010)
	antisense	5'- ttc gtc caa gcc tcc gac -3'	
	Sonde	5'-FAM tcg tgg tga tgg cgg aga gaa tt TAMRA-3'	

Die Primerassays für die RT-PCR wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.1.4 Material für proteinbiochemische Arbeiten

2.1.4.1 SDS-PAGE und Western Blot

RIPA-Puffer	50 mM Tris/ HCl pH 7,5 , 100 mM NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 5 mM EDTA, 10 mM KH ₂ PO ₄ (beide Merck, Darmstadt, Deutschland), 1% Triton-X 100, 0,25% Desoxycholsäure, Protease- Inhibitor Cocktail, 20mM Natriumfluorid, 0,2mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1mM Natrium-Molybdat, 20mM Glycerin-2-Phosphat, 1mM Natriumphosphatpuffer, (alle Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland), 10% Glycerol (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland), 1Tbl./ 10ml PhosStop (Roche, Mannheim, Deutschland)
BSA	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bradford Reagenz	BioRad, München, Deutschland 5x SDS-Puffer Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
SDS-Polyacrylamid-Sammelgel	A. dest, 5% Acrylamid 30% (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 0,17M Tris pH 7,4, 0,1% Natriumdodecylsulfat (beide Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1% Ammoniumpersulfat, 0,1% TEMED (beide Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland)
SDS-Polyacrylamid-Trenngel	A. dest, 6 bis 10% Acrylamid 30% (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 0,4M Tris pH 8,8, 0,1% Natriumdodecylsulfat (beide Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1% Ammoniumpersulfat, 0,1% TEMED (beide Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland),
Gellaufpuffer pH 8,3	25mM Tris, 0,1% Natriumdodecylsulfat (beide Roth, Karlsruhe, Deutschland), 250mM Glycin (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland),

Transferpuffer pH 8,4	25mM Tris, 0,1% Natriumdodecylsulfat (beide Roth, Karlsruhe, Deutschland), 500mM Glycin (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) 20% Methanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
Polyvinylidenfluorid- (PVDF)	
Membran Immobilon P	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Filterpapier	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TBS-Tween 20 pH 7,4	20mM Tris, 140mM NaCl (beide Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Proteinmarker	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Milchpulver blotting grade	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4 primäre Western Blot Antikörper

	Blockierungslösung	Antikörperverdünnung
GAPDH (Santa Cruz biotechnology, Heidelberg, Deutschland)	1% Milchpulver 1% BSA in TBS-Tween20	1:1000
gp130 (Santa Cruz biotechnology, Heidelberg, Deutschland)	5% Milchpulver in TBS-Tween20	1:500
TGF- β (Cell Signaling Technology Danvers, MA, USA)	5% BSA in TBS-Tween20	1:500

2.1.4.2 ELISA

Hirnhomogenatpuffer	20mM Tris/HCL pH 7,3 , 140mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 2mM Na ₃ PO ₄ (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1Tbl./50ml Complete TM Protease Inhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland)
---------------------	---

TGF- β 1 Quantikine Assay	R&D Systems, Abingdon, UK
TGF- β 2 Emax Immunoassay System	Promega, Madison, WI, USA
IL-27 p28 Immunoassay	R&D Systems, Abingdon, UK

2.1.4.3 Durchflusszytometrie

Zellmedium	Hank's, 3% FKS (beide PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
Percoll TM	GE Healthcare, München, Deutschland
0,1M PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Normal mouse serum	Jackson Immuno Research, Newmarket, Großbritannien
GolgiPlug TM	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ionomycin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Cytofix/ Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PermWash	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 5 Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Firma	Verdünnung	Detektierter Zelltyp
Rat-IgG Pe	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Isotypkontrolle
Hamster-IgG PE	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Isotypkontrolle
Rat-IgG FITC	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Isotypkontrolle
Rat-IgG V450	BD Biosciences	0,5µg / 1*10 ⁶ Zellen	Isotypkontrolle
Rat-PeCy5	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Isotypkontrolle
CD8-Pe	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	CD8+ T-Zellen
CD4-Pe	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	CD4+ T-Zellen
MHC-Klasse II-Pe	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Monozyten/Makrophagen
B220-FITC	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	B-Zellen
CD45-PeCy5	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Leukozyten, Mikroglia
CD45-APC	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Leukozyten, Mikroglia
CD11b-APC	eBioscience	2,5µg / 1*10 ⁶ Zellen	Mikroglia
Ly6C-FITC	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Makrophagen
Ly6G (Gr1)-Pe	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	Granulozyten
F4/80-Pacific Blue	BD Biosciences	0,5µg / 1*10 ⁶ Zellen	Makrophagen
F4/80-FITC	BD Biosciences	0,5µg / 1*10 ⁶ Zellen	Makrophagen
IFN-γ-APC	BD Biosciences	0,5µg / 1*10 ⁶ Zellen	
IFN-γ-Pe	BD Biosciences	0,5µg / 1*10 ⁶ Zellen	
IL-17-Pe	BD Biosciences	0,25µg/1*10 ⁶ Zellen	
gp130-Biotin	R&D Systems	2,5µg / 1*10 ⁶ Zellen	
CD16/32	BD Biosciences	1µg / 1*10 ⁶ Zellen	

2.1.4.4 LDH-Assay

Cytotox96® Non-Radioactive

Cytotoxicity Assay

Promega, Madison, WI, USA

2.1.5 Material für Immunzytochemie**Tabelle 6 primäre Antikörper für Immunzytochemie**

Primäre Antikörper	Verdünnung
Purified Mouse antibody Mono β -Tubulin (Covance, Princeton, NJ, USA)	1:400
Rabbit Anti- GFAP (biomeda corp., Forster City, CA, USA)	1:500
Rat Anti-GFAP (Zymed, San Francisco, CA, USA)	1:500
Anti-Toxoplasma polyclonal rabbit (BioGenex, Fremont, CA, USA)	1:200

Tabelle 7 sekundäre Antikörper für Immunzytochemie

Sekundäre Antikörper	Verdünnung
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+I) (Jackson Immuno Research, Newmarket, Großbritannien)	1:500
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+I) (Jackson Immuno Research, Newmarket, Großbritannien)	1:500
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+I) (Jackson Immuno Research, Newmarket, Großbritannien)	1:500
Cy TM 2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+I) (Jackson Immuno Research, Newmarket, Großbritannien)	1:500

PFA 4%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>In situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche, Mannheim, Deutschland
Permeabilisierungslösung	0,5% Triton-X 100 (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) in 0,1M PBS (PAA, Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
Blockierungslösung	10% Ziegen Serum (Dianova, Hamburg, Deutschland), 2% BSA, 5% Sucrose, 0,3% Triton-X 100 (alle Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland), in 0,1M PBS)
DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride)	Biochemica, Moers, Deutschland
Einbettmedium	49% Vectashield (Vector Labs, Peterborough, Großbritannien), 49% Glycerol (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland), 2% 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 tierexperimentelle Methoden

2.2.1.1 Zucht gentechnisch veränderter Mauslinien

Sämtliche Tierexperimente wurden vom Landesverwaltungsamt Halle unter den Aktenzeichen AZ 42502-2-822, AZ 42502-2-822 und AZ 42502-3-621 genehmigt. Alle Mäuse wurden im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Magdeburg gezüchtet und bei einem 12h Tag-Nacht-Rhythmus sowie Wasser und Futter *ad libitum* gehalten.

Es wurden Mäuse verwendet, deren Exon 16 des gp130-Gens homozygot durch zwei *loxP* Sequenzen flankiert war (C57/BL6 gp130^{fl/fl}) (Betz et al., 1998). Das Exon 16 codiert für die Transmembranregion des gp130 Rezeptors, so dass eine Deletion dieser Region zu einem verkürzten Protein führt, welches nicht mehr in der Zellmembran verankert werden kann und keine extrazelluläre Domäne besitzt.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche transgene Cre-Mauslinien verwendet. Zur Deletion des Proteins in Neuronen wurden Mäuse verwendet, in deren Genom der Synapsin-I Promotor aus der Ratte eingefügt war. (C57/BL6-Synapsin-I-Cre^{+/-}) (Hoesche et al., 1993). Um eine Deletion von gp130 in Astrozyten herbeizuführen, wurden Mäuse verwendet, in welchen die Cre-Rekombinase unter den Einfluss des humanen GFAP (hGFAP) Promotors gestellt worden war (C57/BL6 hGFAP-Cre^{+/-}) (Bajenaru et al., 2002). Die C57/BL6 gp130^{fl/fl} Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Werner Müller (University of Manchester, Großbritannien), die C57/BL6-Synapsin-I-Cre^{+/-} Tiere von Dr. Jamey Marth (University of San Diego, USA) und die C57/BL6-hGFAP-Cre^{+/-} Mäuse von Prof. Dr. David H. Gutmann (Washington University School of Medicine, St. Louis, USA) zur weiteren Zucht zur Verfügung gestellt.

Die gp130^{fl/fl} Tiere wurden mit den entsprechenden Cre-Linien analog des Zuchtschemas verpaart, so dass im dritten Verpaarungsschritt erste Cre-positive gp130^{fl/fl} Mäuse vorhanden waren (Abb. 4). Hierbei war zu beachten, dass ein Elternteil Cre-positiv und eines Cre-negativ, und damit die Nachkommen weiterhin heterozygot für die Cre-Rekombinase waren, um eine zufällige homozygote Insertion des Promotor-Cre-Konstrukts im gleichen Gen zu vermeiden. Des weiteren ist bekannt, dass das Synapsin-I Gen in der männlichen Keimbahn exprimiert wird, so dass, um Mosaiktiere zu vermeiden, die C57/BL6-Synapsin-I-Cre^{+/-} Tiere stets weiblich sein mussten (Rempe et al., 2006).

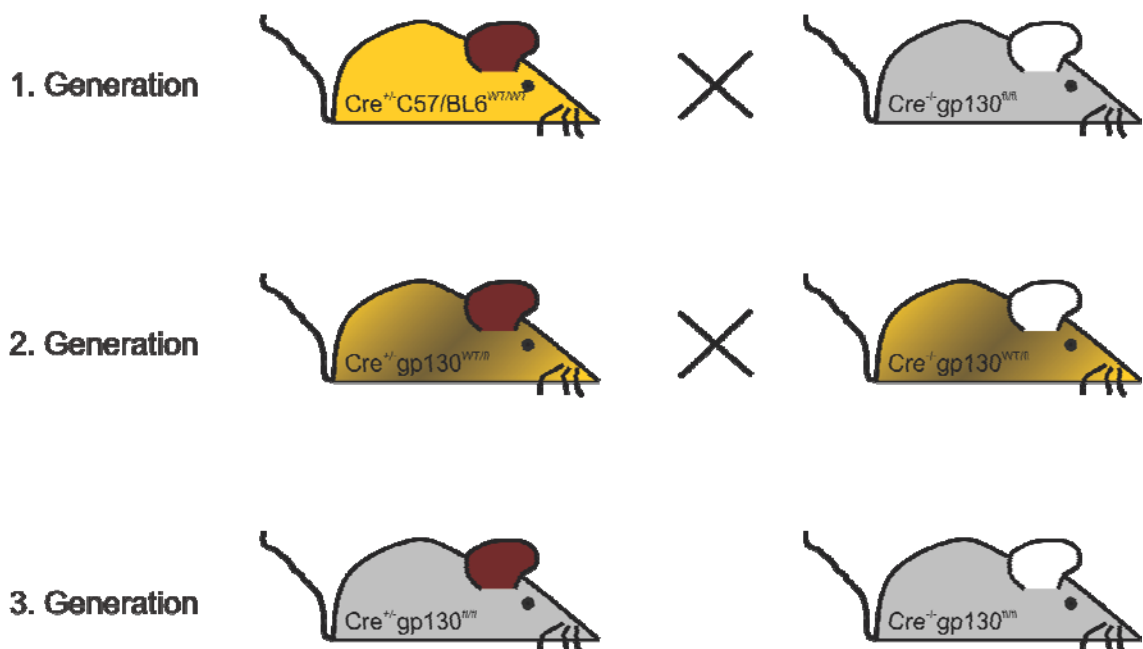


Abb. 4 Zuchtschema

Durch Kreuzung von Mäusen mit einem *loxP*-flankierte Abschnitt des gp130-Gens und Cre-exprimierenden Mäusen können Tiere mit einer konditionalen gp130-Deletion gezüchtet werden.

2.2.1.2 Infektion von Mäusen mit *T. gondii*

Die Infektion der Experimentalmäuse erfolgte mit *T. gondii*-Zysten, die aus Spendermäusen gewonnen wurden. Dazu wurden NMRI-Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) verwendet, welche 2 bis 3 Monate zuvor oral mit 5 Zysten eines Typ II Stammes von *T. gondii* (DX) infiziert worden waren. Im Gehirn dieser Mäuse bildeten sich Zysten aus, mit denen dann die Experimentalmäuse infiziert wurden (Deckert et al., 2006).

Zur Zystengewinnung wurden diese Mäuse in CO₂ getötet, dekapitiert und das Gehirn in 2ml sterilem PBS mit Hilfe von Knopfkanülen und Injektionskanülen zerkleinert. Anschließend wurden 20µl dieser Suspension auf einen Objektträger aufgetropft, mit einem Deckglas abgedeckt und die Zahl der Zysten bei 10-facher Vergrößerung mikroskopisch bestimmt.

Den Experimentaltieren wurden zu Beginn des Versuches 5 *T. gondii*-Zysten in 200µl PBS intraperitoneal injiziert. Zur oralen Infektion der NMRI-Spendermäuse mit Toxoplasmen, wurden 5 Zysten in 500µl PBS oral mittels einer Schlundsonde verabreicht.

2.2.1.3 Organentnahme aus adulten Mäusen

Zum Nachweis der zelltypspezifischen Deletion (siehe Abschnitt 3.2.3.3) wurden adulten Tieren Organe entnommen und mittels einer deletionsspezifischen PCR auf den Verlust des geflochtenen Genabschnittes untersucht. Dazu wurden die Tiere mit CO₂ getötet und ca. 10 min kardial mit 0,1M PBS perfundiert, so dass das PBS durch den Körperkreislauf geleitet und das Blut heraus gespült wurde. Anschließend wurden die Organe entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Um Untersuchungen des Gehirns durchzuführen, wurden die perfundierten Mäuse dekapitiert, der Schädelknochen vorsichtig entfernt und das Gehirn entnommen. Für histologische Untersuchungen wurde das verletzungsfrei entnommene Gehirn entweder mit Einbettmedium umschlossen, in -80°C kaltem 2-Methylbutan schockgefroren und anschließend trocken bei -80°C gelagert oder 24h in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend bei 4°C in PBS aufbewahrt.

2.2.1.4 Präparation neonataler Astrozytenkulturen und embryonaler Neuronenkulturen

Zur Kultivierung von Astrozyten wurden Gehirne 0 bis 1 Tage alter Mäuse präpariert. Die Tiere wurden einer Hautdesinfektion mit 70%igem Ethanol unterzogen und dann sofort dekapitiert. Der Kopf wurde in 37°C warmem Hank's aufgenommen und das Gehirn für die Astrozytenkultur präpariert (siehe Abschnitt 2.2.2.2).

Die primären Neuronenkulturen wurden aus Hirnen embryonaler Mäuse des Embryonaltages 18,5 (E18,5) gewonnen. Dazu wurde der trächtigen Maus nach der Hautdesinfektion das Abdomen geöffnet und der Uterus freigelegt. Der Uterus wurde eröffnet und die Embryonen im unverletzten Amnion entnommen, Anschließend wurde das Amnion entfernt, der Embryo dekapitiert und der Kopf in eine neue sterile Petrischale mit Hank's gegeben. Unter dem Binokular wurden zuerst die Kopfhaut und danach der Schädel entlang der Mittellinie aufgeschnitten, eine Pinzette unter das Gehirn geführt und das Hirn nach kaudal herausgeklappt. Im Folgenden wurden die Meningen von den Großhirnhemispären vorsichtig entfernt und die Kortexhälften abgetrennt. Diese wurden in eine neue Petrischale mit sterilem Hank's überführt, die Plexus entfernt, das Gewebe mit einer Schere in kleine Stücke zerteilt und zur weiteren Verarbeitung (siehe Abschnitt 3.2.2.3) in ein 15 ml Falconröhrchen mit Hank's gegeben.

2.2.2 Zellkulturtechniken

2.2.2.1 Vorbereitung der Zellkulturmaterialien

Um Astrozyten und Neuronen auf Glasdeckgläsern kultivieren zu können, wurden diese abgeflammt, um die Oberfläche für die Zellen zugänglicher zu machen und das Material zu sterilisieren. Die Kultivierung von Neuronen erforderte eine Beschichtung der Oberflächen mit PDL für 1h. Nach entfernen der PDL-Lösung wurde die Oberfläche mit sterilem A. dest gewaschen. Nach vollständiger Trocknung wurden die Materialien einer UV-Bestrahlung unterzogen, um eventuelle Kontaminanten zu eliminieren.

2.2.2.2 Astrozytenkultur

Die frisch präparierten Hirne neonataler Mäuse wurden durch ein 70 µm Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) dissoziiert und die Zellen in 25 cm² großen Zellkulturflaschen mit Astrozytenmedium I kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 5 Tagen, wobei dann auf Astrozytenmedium II umgestellt wurde. Weitere

Medienwechsel erfolgten alle 3 bis 4 Tage, bis der Zellrasen subkonfluent war. Zum Umsetzen wurden die Zellen 3h bei 500 rpm geschüttelt um kontaminierende Mikrogliazellen abzulösen, 2x mit sterilem 0,1M PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei) gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen überführt, das Trypsin durch Zugabe von Astrozytenmedium I inaktiviert und die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 1200 rpm pelletiert. Die Zellen wurden in Astrozytenmedium I aufgenommen und in 75 cm² Zellkulturflaschen plattiert. War der Zellrasen auch in diesen Flaschen annähernd konfluent, wurden die Zellen ein zweites Mal passagiert und auf die für die Versuchsdurchführung vorgesehenen Zellkulturmaterialien plattiert. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen und anschließender Zellzählung konnten >80% GFAP⁺ DAPI⁺ Astrozyten und <20% GFAP⁻ DAPI⁺ kontaminierende Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5A).

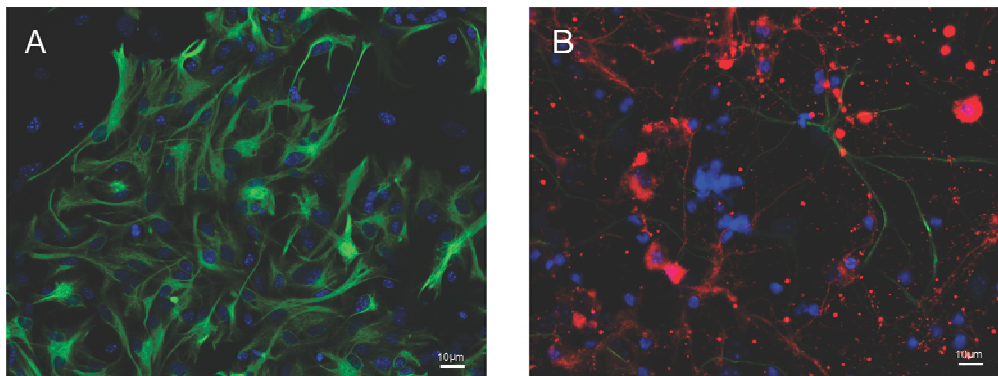


Abb. 5 Darstellung der Reinheit der Astrozyten- und Neuronenkulturen

A Immunfluoreszenzfärbung einer Astrozytenkultur (GFAP: grün, DAPI: blau, 40-fache Vergrößerung)
B Immunfluoreszenzfärbung einer Neuronenkultur (β -III-Tubulin: rot, GFAP: grün, DAPI: blau, 40-fache Vergrößerung)

2.2.2.3 Neuronenkultur

Um eine schonende Gewebedissoziation zu ermöglichen, wurden die nach dem Präparieren vorhandenen Hirngewebestückchen der E18,5-Tiere für 25 min bei 37°C im Wasserbad trypsinisiert. Anschließend wurde das Trypsin weitestgehend entfernt und durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor/DNase-Lösung das restliche Trypsin inaktiviert und die in der Lösung befindliche DNA verdaut. Nach einmaligem Waschen mit Hank's wurden 950µl Neurobasal-Medium zugegeben und durch vorsichtige Kanüendissoziation (21G und 23G) aus den Gewebestücken eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden auf PDL-beschichteten Materialien plattiert. Zur Kontrolle der Zellkulturreinheit wurden Fluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Zellzählungen ergaben einen Anteil von >98% β -III-Tubulin⁺ GFAP⁻ Neuronen und <2% GFAP⁺ β -III-Tubulin⁻ Astrozyten (Abb. 5B).

2.2.2.4 Kultivierung von HFF-Zellen

HFF-Zellen (ATCC, Manassas, VA, USA) wurden zur Zucht von Toxoplasmen *in vitro* benötigt. Die Zellen wurden in 75cm² Zellkulturflaschen (Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) in HFF-Kultivierungsmedium gezüchtet, nach Erreichen der Konfluenz mit 10 ml Trypsin abgelöst, gewaschen und 1/5 der Zellsuspension wieder in 75cm² Zellkulturflaschen kultiviert.

2.2.2.5 Zucht von Toxoplasmen in der Zellkultur

Konfluent gewachsene HFF-Zellen wurden mit dem DX-Stamm von *T. gondii* infiziert und bis zur Lyse der Wirtszellen durch den Parasiten in 15 ml HFF-Kultivierungsmedium in 75cm² Zellkulturflaschen weiter kultiviert. War ein Großteil der Wirtszellen lysiert, wurde 1 ml des Überstandes abgenommen und auf eine nicht infizierte HFF-Kultur gegeben. Um Toxoplasmen für Zellkulturversuche zu gewinnen, wurde der gesamte Überstand in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, die Zellbestandteile bei 50x g für 5 min pelletiert und der parasitenreiche Überstand durch ein Spritzenfilter mit 5 μ m Porengröße filtriert, (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) um sämtliche Zellreste zu entfernen. Nach dreimaligem Waschen mit 50 ml 0,1M PBS (400x g, 20 min) wurde die Zahl der Toxoplasmen bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.2.6).

2.2.2.6 Ermittlung der Zellzahl mit Trypanblau

Mit dem Farbstoff Trypanblau wurde eine Vitalfärbung durchgeführt, da er nur in tote Zellen eindringen kann und Zellen mit intakter Zellmembran hell dargestellt werden. Die Zahl der lebenden Zellen wurde mikroskopisch in einer Neubauerzählkammer ermittelt.

2.2.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen für eine spätere Verwendung zu lagern, wurden die Zellsuspensionen pelletiert und die Zellen mit 1 ml Einfriermedium in ein Einfrieröhrchen überführt und

über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen eine weitere Nacht auf -80°C gekühlt und danach dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Die Zellen wurden rekultiviert, indem die tief gefrorene Zellsuspension aus dem flüssigen Stickstoff schnell unter handwarmem Wasser aufgetaut und mit 10 ml des zellentsprechenden Mediums gewaschen wurde. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1200 rpm wurde das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellen in die Kulturflaschen überführt.

2.2.2.8 Stimulation kultivierter Zellen

Kulivierte Neuronen wurden mit den in Tabelle 4 angegebenen Zytokinen für 24h oder 48h stimuliert:

Tabelle 8 Zytokine zur Neuronenstimulation

Zytokin	Konzentration	Beginn der Stimulation
CLC	20ng / ml	zeitgleich mit Infektion
CNTF	50ng / ml	zeitgleich mit Infektion
CT-1	20ng / ml	zeitgleich mit Infektion
IL-11	20ng / ml	zeitgleich mit Infektion
IL-27	20ng / ml	zeitgleich mit Infektion
IL-6	20ng / ml	zeitgleich mit Infektion
LIF	50ng / ml	zeitgleich mit Infektion
OSM	50ng / ml	zeitgleich mit Infektion
IFN γ	100 U / ml	24 h vor Infektion
TNF- α	100 U / ml	zeitgleich mit Infektion

Kulivierte Astrozyten wurden mit den in Tabelle 5 angegebenen Zytokinen für 24, 48h oder 60h stimuliert:

Tabelle 9 Zytokine für die Astrozytenstimulation

Zytokin	Konzentration	Beginn der Stimulation
IFN- γ	100 U / ml	24 h vor Infektion
TNF- α	100 U / ml	zeitgleich mit Infektion

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Genotypisierung lebender Tiere wurde eine Gewebeprobe der Schwanzspitze entnommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Daraus wurde unter Verwendung des easyDNA Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers die genomische DNA isoliert.

2.2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Organen und Toxoplasmen

Die Isolation genomischer DNA aus Organen erfolgte aus den eingefrorenen Geweben (siehe 3.2.1.2) mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kits nach Herstellerangaben. Dazu wurden 25 μ g Gewebe in Lysispuffer in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Hilfe einer Pipette zerkleinert und mit Proteinase K verdaut. Die DNA wurde anschließend über eine Säule aufgereinigt und mit 100 μ l A. dest. eluiert.

Aus einer vorher bestimmten Zahl von kultivierten *Toxoplasmen* wurde die DNA ebenfalls mit dem DNeasy Blood and Tissue Kits nach Herstellerangaben extrahiert und diese DNA als Standardreihe in der real-time PCR verwendet.

2.2.3.3 Genotypisierung der Mäuse und Nachweis der Deletion mittels PCR

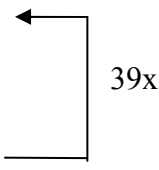
Die Genotypisierungen sowohl des gp130-Gens, als auch des Cre-Transgens wurde mittels PCR-Analyse der Schwanz-DNA durchgeführt. Das gp130-Wildtyp-Allel hatte im Agarosegel eine Bandengröße von 340 bp, das *loxP*-flankierte Allel 400 bp. Die Expression der Cre-Rekombinase wurde promotorspezifisch analysiert und zeigte für hGFAP-Cre eine Bandengröße von 850 bp und für Synapsin-I-Cre eine Größe von 450 bp.

Pro Ansatz wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

A. dest	19,375 μ l
10x Puffer	2,5 μ l
dNTPs	0,5 μ l
Primer sense	0,5 μ l
Primer antisense	0,5 μ l
Polymerase	0,125 μ l
DNA	1,5 μ l

25 μ l Gesamtvolumen

Alle Amplifikationen wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

	Dauer	Temperatur	Zyklen
1 Aktivierung der Polymerase	10 min	95°C	
2 Denaturierung der DNA	45 sek	95°C	
3 Anlagerung der Primer	45 sek	58°C	
4 Verlängerung der Fragmente	45 sek	72°C	
5 Finale Fragmentverlängerung	7 min	72°C	
6 Abkühlung und Aufbewahrung	∞	4°C	

2.2.3.4 Isolation von mRNA aus Gewebe und Generierung von cDNA

An definierten Tagen nach der Infektion mit *T. gondii* wurden Mäuse getötet und Hirngewebe für Genexpressionsanalysen entnommen. Das Gewebe wurde zunächst in mit β -Mercaptoethanol versetztem RLT- Puffer mittels einer Pipette dissoziiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Zum vollständigen Aufschluss der Zellen, wurde die aufgetaute Suspension mechanisch dissoziiert (Qiashredder, Qiagen, Hilden, Deutschland). Anschließend wurde die mRNA nach Anweisungen des Herstellers mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert und mit 50µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die mRNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt und die gewünschte mRNA-Menge zu cDNA umgeschrieben.

Um cDNA zu erhalten, wurden dem mRNA-Eluat 2,5µl Oligo-dT und 4,5µl dNTPs zugesetzt. Der Ansatz wurde 5 min auf 65°C erhitzt, um eventuelle Sekundärstrukturen aufzubrechen. Nach einem kurzen Abkühlschritt auf Eis wurden 16 µl 5x *First Strand Buffer*, 8 µl DTT (10mM), 3,5 µl A.dest und 1,5 µl Superscript II Reverse Transcriptase zugefügt, gemischt und der Ansatz 50 min bei 42°C zur cDNA- Synthese inkubiert. Abschließend wurde die cDNA 10 min auf 70°C erhitzt, um die Reaktion abzustoppen.

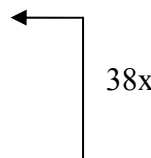
Zum Ausschluss einer Kontamination der cDNA mit genomischer DNA wurde eine PCR für das HPRT-Gen durchgeführt. Diese PCR war so gestaltet, dass die Bandengröße für HPRT aus der cDNA bei 145 bp lag, die Größe des Fragments von genomischer DNA betrug hingegen 984 bp, so dass eine gute Unterscheidung der Banden möglich war. Wurde genomische DNA detektiert, wurde die cDNA verworfen.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

A. dest	19,375 µl
10x Puffer	2,5 µl
dNTPs	0,5 µl
Primer sense	0,5 µl
Primer antisense	0,5 µl
Polymerase	0,125 µl
cDNA	1,5 µl

25 µl Gesamtvolumen

Die HPRT cDNA-Kontroll-PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

	Dauer	Temperatur	Zyklen
1 Aktivierung der Polymerase	10 min	95°C	
2 Denaturierung der DNA	45 sek	94°C	
3 Anlagerung der Primer	45 sek	52,5°C	
4 Verlängerung der Fragmente	30 sek	72°C	
5 Finale Fragmentverlängerung	7 min	72°C	
6 Abkühlung und Aufbewahrung	∞	4°C	

2.2.3.5 Semiquantitative RT-PCR

Aus Gehirnen nicht-infizierter und 7, 14, 21, 28 und 42 Tage infizierter C57/BL6-Mäuse wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und gleiche Mengen hinsichtlich der Expression der IL-6 Zytokine untersucht.

2.2.3.6 RT-PCR

Zur Durchführung der RT-PCR wurde pro well folgender Ansatz verwendet:

Taqman® Universal PCR Master Mix	12,5 µl
Taqman® Gene Expression Assay	1,0 µl
cDNA	2,5 µl
A.dest	9 µl

25 µl Gesamtvolumen

Alle RT-PCRs wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

	Dauer	Temperatur	Zyklen
1 Aktivierung der Uracil-N-Glykosylase (UNG)	2 min	50°C	
2 Initiale Denaturierung der cDNA	10 min	95°C	
3 Denaturierung der cDNA	15 s	95°C	← 39x
4 Anlagerung der Primer und Fragmentverlängerung	60 s	60°C	
5 Abkühlung und Aufbewahrung	∞	8°C	

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001).

2.2.3.7 Real-time PCR

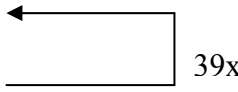
Die Quantifizierung der Parasitenbelastung in den Gehirnen infizierter Mäuse wurde mittels real-time PCR durchgeführt. Dazu wurde von der aus den Toxoplasmen gewonnenen DNA eine Verdünnungsreihe hergestellt, in denen die DNA-Menge 0 bis 1×10^5 Parasiten entsprach. Von der aus den Gehirnen gewonnenen DNA wurden 200 ng eingesetzt. Anhand der mitgeführten Standardreihe konnten dann die Parasitenbelastung abgelesen werden. Für die Analyse wurden zwei unterschiedliche Markergene, das TgB1-Gen und die hochrepetitive 529 bp- Sequenz herangezogen.

Pro well wurde folgender Ansatz mit den in Tabelle 3 aufgeführten Primern und Sonden verwendet:

Taqman® Universal PCR Master Mix	12,5 µl
Primer sense	1,0 µl
Primer antisense	1,0 µl
Sonde	1,0 µl
DNA	2,5 µl
A.dest	7 µl

25 µl Gesamtvolumen

Alle real-time PCRs wurden mit folgendem Programm durchgeführt:

	Dauer	Temperatur	Zyklen
1 Aktivierung der Uracil-N-Glykosylase (UNG)	2 min	50°C	
2 Initiale Denaturierung der DNA	10 min	95°C	
3 Denaturierung der DNA	15 s	95°C	
4 Anlagerung der Primer und Fragmentverlängerung	60 s	60°C	
5 Abkühlung und Aufbewahrung	∞	8°C	

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Isolation von Gesamtzellproteinen aus kultivierten Zellen

Zur Gewinnung von Gesamtzellproteinen aus kultivierten Astrozyten und Neuronen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend kalter RIPA- Puffer auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden zusätzlich

mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund gelöst und 15 min bei 4°C lysiert. Die Suspension wurde dann 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um feste Zellbestandteile abzutrennen. Der Proteingehalt des Überstandes wurde photometrisch mit Hilfe des Bradford-Reagenz' (Bradford, 1976) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Absorption wurde bei 595nm in einem Spektralphotometer (Nanodrop 1000, Wilmington, DE, USA) ermittelt, wobei der verwendete Proteinlysepuffer als Abgleich diente.

2.2.4.2 SDS-PAGE

Gleiche Proteinmengen wurden mit 5x SDS-Puffer vermischt, für 5 min auf 95°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzulösen, 2 min auf Eis abgekühlt, in einer gekühlten Zentrifuge kurz anzentrifugiert und bis zum Auftragen auf das Gel kurzzeitig auf Eis gelagert. Die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (Laemmli, 1970).

2.2.4.3 Western Blot

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer *semi-dry*-Blotkammer (BioRad, München, Deutschland) auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Blockierungslösung in einem Falcon-Röhrchen rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper wie in Tabelle 6 angegeben über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in 0,1 %-TBS-Tween20 bei Raumtemperatur folgte die 60-minütige Inkubation mit dem sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörper bei Raumtemperatur. Hierzu wurde der Antikörper 1:1000 in Blockierungslösung verdünnt. Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 10 min in 0,1%-TBS-Tween20 bei Raumtemperatur wurde der Blot nach Herstellerangaben mit dem Substratansatz (ECL-Kit, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) inkubiert. Die durch die Peroxidasereaktion emittierten Lichtsignale wurden mit dem Lumi Imager F-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) visualisiert.

2.2.4.4 TGF- β 1-, TGF- β 2- und IL-27-ELISA

Zur Vorbereitung der Proben wurden ca. 20 μ g Hirngewebe in Hirnhomogenatpuffer aufgenommen und mit Hilfe eines Pistills zerkleinert. Die Menge des enthaltenen Proteins wurde mittels Bradford Assay bestimmt und für jeden Test die gleiche Menge Protein eingesetzt.

Zur Bestimmung der Zytokine TGF- β 1, TGF- β 2 und IL-27 wurden kommerziell erhältliche ELISA Kits nach Angaben des Herstellers verwendet. Die abschließende Farbreaktion wurde im Fotometer (SpectraFluor Plus, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450 nm gemessen und mit einer Standardkurve abgeglichen. Die Bestimmung jeder Probe erfolgte im Triplikat.

2.2.4.5 LDH-Assay

Der LDH-Assay wurde eingesetzt, um die zytotoxische Wirkung verschiedenster Substanzen auf zelluläre Systeme zu messen. Dazu wurden die zu untersuchenden Astrozyten bzw. Neuronen in definierter Zahl in 96-well-Platten eingesät. Die Astrozyten wurden nach 4 Tagen, die Neuronen nach 7 Tagen für 24 h oder 48 h mit *T. gondii* infiziert und/oder mit den angegebenen Zytokinen stimuliert. Danach wurde die Menge der von geschädigten Zellen freigesetzten LDH im Zellkulturüberstand unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen LDH-Assays bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch (SpectraFluor Plus, Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

2.2.5 Immunzytochemische Methoden

Die kultivierten Zellen wurden nach Entfernen des Mediums mit 4% PFA für 20 min bei Raumtemperatur fixiert, ein Mal mit sterilem PBS gewaschen und bis zur Färbung in sterilem PBS bei 4°C gelagert.

2.2.5.1 Färbung apoptotischer Zellen

Zur Darstellung apoptotischer Zellen wurde eine TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP- biotin nick end labeling)- Färbung durchgeführt. Die Methode beruht auf der Detektion von DNA-Strangfragmentationen, die durch die Aktivität von Endonukleasen entstehen. Die Strangbrüche werden fluoreszenzmarkiert und können im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die auf den

Deckgläsern fixierten Zellen wurden nach Herstellerangaben behandelt. An die TUNEL-Färbung schloss sich eine Immunfluoreszenzfärbung an.

2.2.5.2 Fluoreszenzmarkierung von Neuronen, Astrozyten und Toxoplasmen

Fixierte Kulturen wurden für 5 min mit Permeabilisierungslösung inkubiert, um die intrazellulären Bestandteile für die nachfolgende Färbung zugänglich zu machen. Nach einem Waschschriff mit 0,1 M PBS folgte die Absättigung unspezifischer Bindungen durch die Blockierungslösung für 45 min bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurden ungebundene primäre Antikörper durch dreimaliges Waschen mit sterilem PBS entfernt, unspezifische Bindungen nochmals für 10 min geblockt und die Zellen mit den sekundären Antikörpern für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI für 10 min angefärbt. Dabei lagert sich dieser Fluoreszenzfarbstoff an die DNA an und markiert so den Zellkern. Abschließend wurden die Deckgläser auf entfetteten Objektträgern mit Einbettmedium dauerhaft fixiert.

2.2.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die gefärbten Präparate wurden mit einem Leica DMRE7 (Leica, Wetzlar, Deutschland) und einer daran angeschlossenen CCD-Kamera Spot-RT (Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA) analysiert und dokumentiert. Die Überlagerung der bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommenen Bilder erfolgte mit der ImageJ Software (National Institute of Health, USA).

2.2.5.4 Isolation zerebraler Leukozyten

Zur Analyse intrazerebraler Leukozytenpopulationen wurden diese aus infizierten und nicht-infizierten Hirnen isoliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Nach der Perfusion der Maus wurde das Gehirn entnommen und mittels Passage durch ein Zellsieb mit 100 µm Porengröße in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Zellen wurden in Zellmedium aufgenommen und durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 6 min pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml Percoll mit einer Dichte von 1,098 g/ml resuspendiert. Um die Dichtegradienten zu erhalten, wurde die Zellsuspension mit 10 ml Percoll der Dichte 1,22 g/ml unterschichtet und beide Schichten dann der Reihe nach

mit je 9ml Percoll der Dichten 1,07 g/ml, 1,05 g/ml, 1,03 g/ml und 1,00 g/ml überschichtet. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte dann mit einer Geschwindigkeit von 1200x g für 20 min bei schnellem Anlauf, jedoch ohne Rotorbremsung. Die oberen Schichten der Dichten 1,00 g/ml und 1,03 g/ml wurden vorsichtig entfernt und verworfen. Die zwischen den Dichten 1,05 g/ml und 1,07 g/ml und 1,098 g/ml des Percollgradienten angesammelten Zellen wurden in ein neues Falcongefäß gegeben und mit reichlich Zellmedium gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in Zellmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.2.6)

2.2.5.5 Durchflusszytometrie

Zur Färbung extrazellulärer Proteine wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert und mit 3 ml kaltem PBS bei 1200 rpm für 6 min gewaschen. Je 10^6 Zellen wurde 1 µg CD16/32 Antikörper, verdünnt in 50 µl PBS + 10% Mausserum, zugegeben und der Ansatz 10 min bei 4°C dunkel inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen mit dem spezifischen Antikörper in der in Tabelle 5 angegebenen Konzentration für 30 min bei 4°C dunkel inkubiert und abschließend mit kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde dann in einer geeigneten Menge PBS resuspendiert und die Zellen bis zur Messung innerhalb von 4 h kalt und dunkel gelagert.

Zur Detektion intrazellulärer Proteine wurde zur Zellsuspension 1 µl/ml GolgiPlug gegeben, um den intrazellulären Proteintransport zu blockieren und die Proteine im Golgi-Komplex der Zelle anzureichern und so besser detektierbar zu machen. Zur Anregung der Zytokinproduktion wurden Phorbol 12-Myristat 13-Azetat (PMA) und Ionomycin in einer Konzentration von jeweils 5 µl/ml zu den Zellen gegeben und der Ansatz 4-6 h bei 37°C inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen zu Blockade unspezifischer Bindungen für 10 min mit einem anti-FcR-Antikörper (CD16/32) in PBS + 10% Mausserum inkubiert. Nach diesen Schritten erfolgte zunächst die Färbung extrazellulärer Proteine durch Zugabe der spezifischen Antikörper und 20-minütige Inkubation bei 4°C in Dunkelheit. Nach zweimaligem Waschen wurden die intrazellulären Proteine angefärbt. Zunächst wurden die Zellen unter Zugabe von 250 µl Cytifix/ Cytoperm 20 min bei 4°C fixiert und permeabilisiert und anschließend 2x mit 1 ml PermWash in einer 1:10- Verdünnung gewaschen. Nun wurden die Zellen 30 min bei 4°C mit den in Perm Wash verdünnten spezifischen Antikörpern inkubiert. Nach weiteren 2 Waschsritten mit PermWash wurden die Zellen pelletiert, in kaltem PBS resuspendiert und bis zur Analyse kurzzeitig auf Eis dunkel gelagert.

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem FACSCalibur (BD Biosciences) durchgeführt und mit derCellQuest oder WinMDI 2.1 Software (BD Biosciences) analysiert.

Um aus kultivierten Astrozyten die kontaminierende Mikroglia zu entfernen, wurden die kontaminierenden Mikrogliazellen mit dem CD45-APC Antikörper gefärbt mit dem FACSVantage Cell Sorter (BD Biosciences) sortiert. Sowohl die positive (Mikroglia) und die negative (Astrozyten) Fraktion wurden gesammelt und mittels deletionsspezifischer PCR (siehe Abschnitt 3.2.3.3 und Tabelle 1) analysiert.

2.2.6 Histologische Methoden

Sämtliche histologischen Färbungen konnten dankenswerterweise im Institut für Neuropathologie der Universität Köln von der Arbeitsgruppe Deckert durchgeführt werden. Je nach verwendeter Färbetechnik wurden von schockgefrorenen Hirnen 10 µm oder paraffinierten Hirnen 1-2µm dicke Schnitte angefertigt und gefärbt.

2.2.6.1 histologische Übersichtsfärbungen paraffinfixierter Gehirne

Die Hämatoxin-Eosin Färbung wurde als Übersichtsfärbung genutzt, um die Strukturen des Gewebes darzustellen. Zur lichtmikroskopischen Darstellung der Neuronen wurden die Paraffinschnitte mit Kresylviolett oder Luxol-fast blue gefärbt. Die periodic-acid Schiff Reaktion (PAS) wurde zur Färbung kohlenhydrathaltiger Moleküle wie Glycogen, Zellulose und Glykolipide verwendet.

2.2.6.2 Immunhistochemische Methoden

An schock gefrorenen Kryoschnitten oder Paraffinschnitten erfolgte die immunhistochemische Färbung folgender Moleküle:

Tabelle 10 Antikörper für Immunhistochemie an gefrorenem Gewebe

Antikörper	Firma	Verdünnung
CD45	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:50
CD4	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:50
CD8	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	1:200
F4/80	Serotec, Oxford, Groß Britannien	1:200
iNOS	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	1:200
NeuN	Chemicon, Hofheim, Deutschland	1:400
GFAP	DAKO, Hamburg, Deutschland	1:500
<i>T. gondii</i>	Gene Tex, Herford, Deutschland	1:400

Tabelle 11 Antikörper für Immunhistochemie an paraffinfixiertem Gewebe

Antikörper	Firma	Verdünnung
GFAP	DAKO, Hamburg, Deutschland	1:500
Synaptophysin	DCS, Hamburg, Deutschland	1:50
Neurofilament Protein L	Chemicon, Hofheim, Deutschland	1:250
Myelin basic protein	DAKO, Hamburg, Deutschland	1:200
TUNEL	<i>In situ</i> Cell Death Detection Kit, POD Roche, Mannheim, Deutschland	----

Für Fluoreszenzfärbungen wurden Kryostatschnitte, und für die ABC-Färbung sowohl Kryostatschnitte als auch Paraffinschnitte, verwendet. Schnitte von paraffinfixierten Gehirnen wurden vor der Färbung zunächst in Xylol entparaffiniert und weiter in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Die Gewebeschnitte wurden für 10 min mit Aceton und anschließend 7 min mit Chloroform auf Objektträgern fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 30 min mit einer Lösung aus 5% BSA und 5% Ziegen Serum blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper für 1 h inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Schnitte für 1 h mit dem biotin-konjugierten sekundären Antikörper, bzw. mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Reaktion gebracht und anschließend ein Mal gewaschen. Fluoreszenz-gefärbte Schnitte wurden im Anschluss mit Mowiol dauerhaft fixiert. Für die ABC-Färbung wurden die Schnitte mit dem Peroxidasegekoppelten Avidin-Biotin-Komplex 40 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurde durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) die Farbreaktion ausgelöst. Nach Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkohoreihe wurden die Präparate mit Corbit dauerhaft fixiert.

2.2.7 Statistik

Alle Daten dieser Arbeit wurden als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) angegeben. Differenzen der Parasitenlast in histologischen Analysen wurden mit dem *Mann-Whitney rank sum test*, Unterschiede hinsichtlich des Überlebens mit der Kaplan-Meier Methode ermittelt und mit dem *log rank test* statistisch analysiert (Bewick et al., 2004). Alle anderen statistischen Angaben wurden mit dem *two-tailed Student's t-test* ermittelt. Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ wurden mit * , $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,005$ mit *** gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung von Mauslinien mit einer Deletion des gp130 Gens in Astrozyten oder Neuronen

Die *loxP*-flankierten Genabschnitte, sowie das hGFAP- und das Synapsin-Cre-Transgen wurden mittels PCR aus Schwanz-DNA nachgewiesen (Abb. 6A,B)

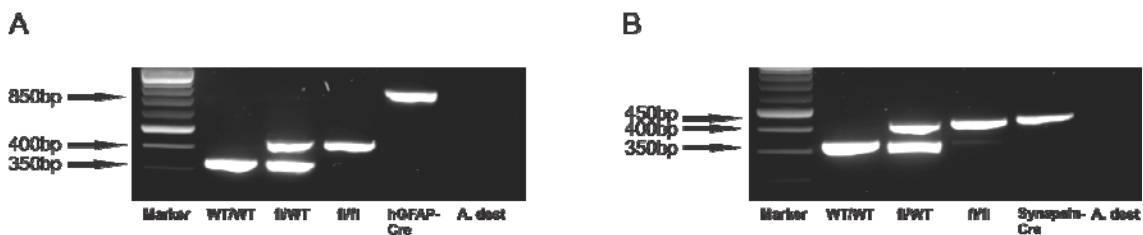


Abb. 6 Genotypisierung der Mäuse
 A hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} B Synapsin-Cre gp130^{fl/fl}

Um den gp130-Verlust in den Geweben zu detektieren, wurde eine deletionspezifische PCR etabliert. Diese zeigte die Rekombination des gp130-Gens sowohl für hGFAP-Cre gp130^{fl/fl}, als auch für Synapsin-I-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse nur im ZNS der untersuchten Tiere. Cre-negative Mäuse zeigten in keinem der untersuchten Gewebe eine Deletion des gp130-Fragments (Abb. 7A,D). Zur Bestimmung des Zelltyps, in welchem sich der deletierte Genabschnitt befand, wurden Neuronen und Astrozyten kultiviert und hinsichtlich des deletierten Genabschnittes untersucht. In den hirnsässigen Zellen der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse konnte die Deletion mittels PCR in Astrozyten und minimal auch in Neuronen festgestellt werden (Abb. 7B). Um dieses Ergebnis zu quantifizieren, wurden die Zellen zusätzlich durchflusszytometrisch untersucht. 83,3% der kultivierten Astrozyten aus hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen waren gp130⁻, während fast alle Astrozyten aus den Kontrolltieren gp130⁺ waren (98,0%). Hingegen war der größte Teil der Neuronen (89,5%) aus hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen positiv für gp130. In den Kontrolltieren waren fast alle Neuronen gp130⁺ (98,0%), was das Ergebnis der deletionspezifischen PCR widerspiegelte. Mikrogliazellen beider Mausstämme waren gleichermaßen schwach positiv für gp130 (Abb. 7C).

In Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen trat die Deletion weder in Astrozyten noch Mikrogliazellen, sondern ausschließlich in Neuronen auf (Abb. 7E). Auf Proteinebene wurde die Deletion der extrazellulären Domäne in kultivierten Neuronen aus Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 7F).

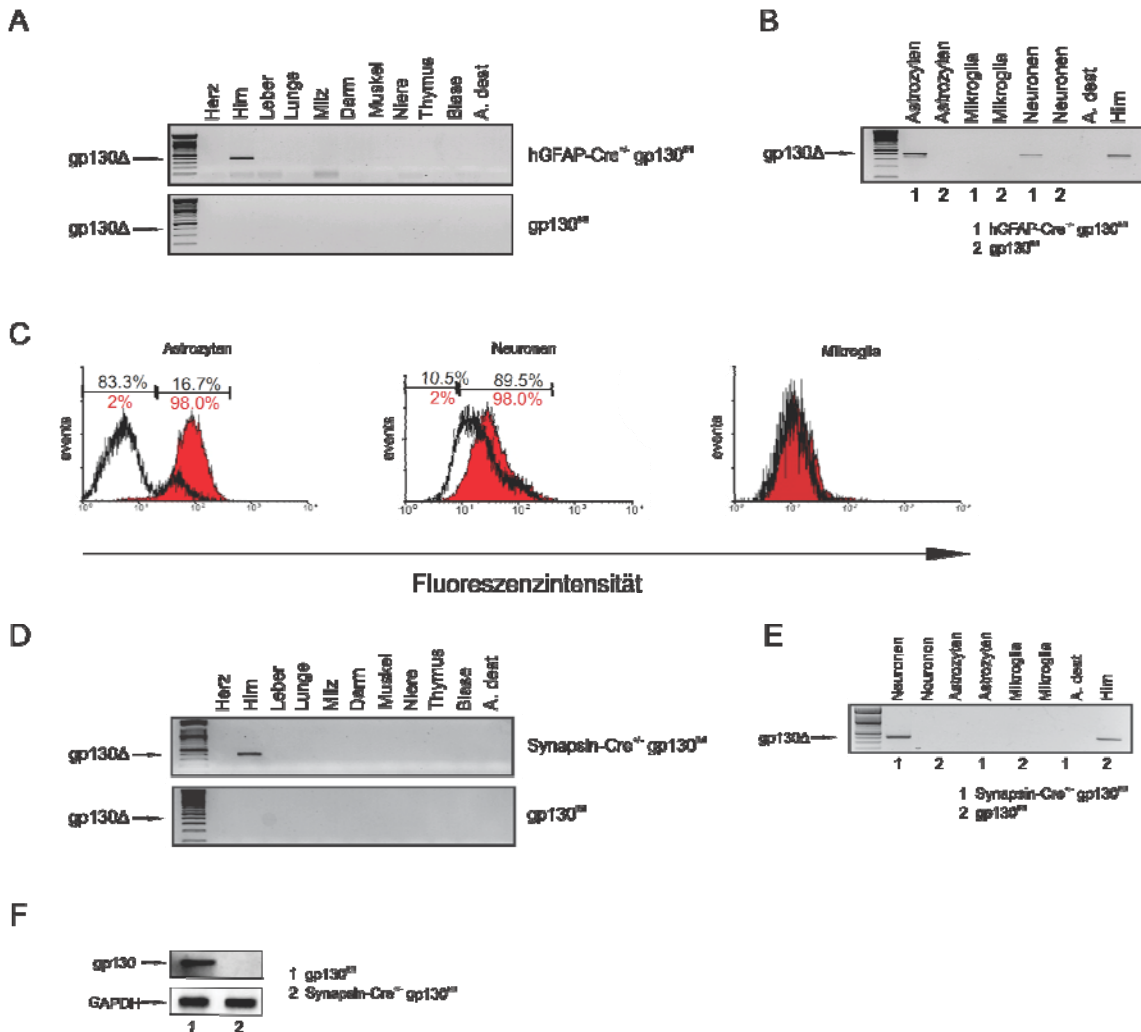


Abb. 7 Charakterisierung der Mäuse

A,D Die deletionspezifische PCR zeigt die Exzision des Genfragments ausschließlich im Gehirn der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} (A) und Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse (D), **B,E** Die Analyse der hirnsässigen Zellen auf eine Deletion des gp130-Gens zeigt die Deletion in den Astrozyten und einem geringen Teil der Neuronen der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere (B) und ausschließlich in den Neuronen der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse (E), **C** durchflusszytometrische Analyse der gp130-Expression der Astrozyten, Neuronen und Mikroglia (gp130^{fl/fl} rot, hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} –weiß), **F** Die Western Blot Analyse kultivierter Neuronen aus gp130^{fl/fl} Tieren und Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen detektierte die Deletion des gp130-Proteins in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren.

3.2 Zytokine der IL-6-Familie wurden bei der TE hochreguliert

Um zu prüfen, ob Zytokine der IL-6-Familie während einer Infektion mit *T. gondii* intrazerebral reguliert werden, wurden C57/BL6-Mäuse intraperitoneal mit 5 Zysten des DX-Stammes von *T. gondii* infiziert. An den Infektionstagen 7, 14, 21, 28 und 42 wurden Proben entnommen und die Expression der IL-6 Zytokine mittels

semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Es zeigte sich, dass, mit Ausnahme von LIF, alle Zytokine der IL-6 Familie bereits am 7. Infektionstag hochreguliert wurden. Ein Höchststand der Expression wurde an den Tagen 21 bzw. 28 nach Infektion erreicht, danach sanken die Zytokinspiegel von IL-6, LIF, OSM und CLC wieder ab, blieben jedoch erhöht gegenüber den nicht infizierten Kontrollen. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die weiteren Analysen der Funktion von astrozytär und neuronal exprimiertem gp130 bei der TE.

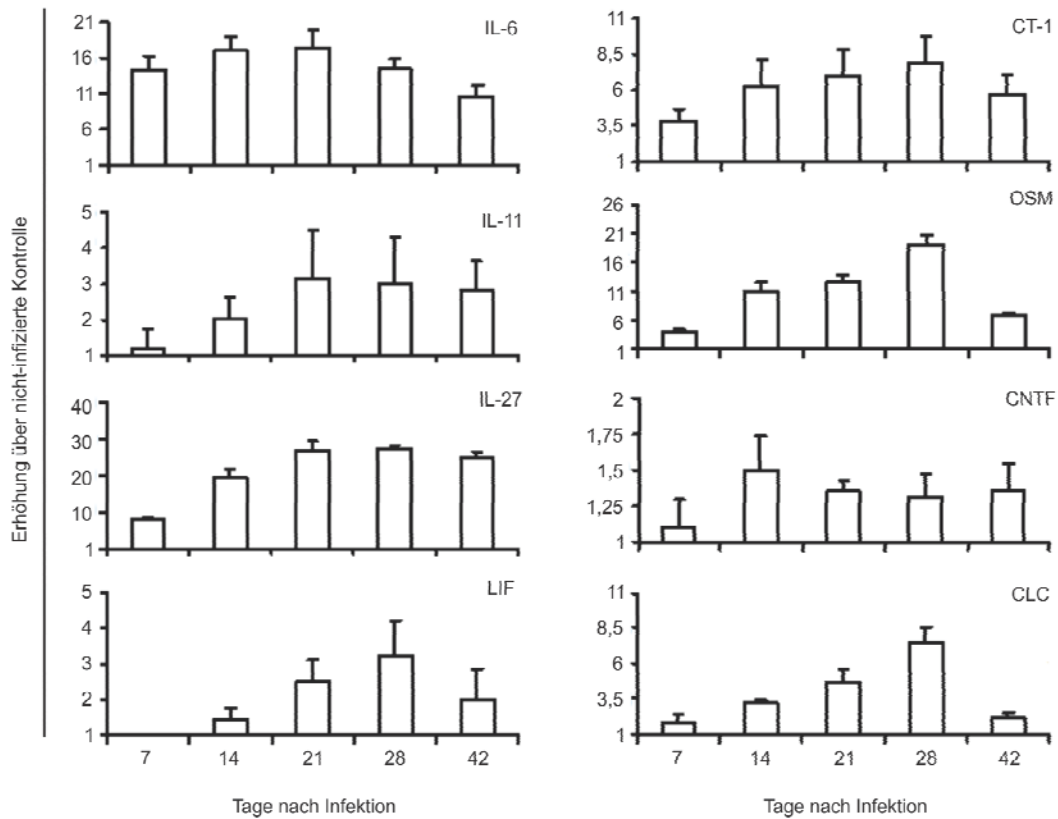


Abb. 8 Regulation der IL-6 Zytokine in der TE

Alle Zytokine der IL-6 Familie wurden in der TE in C57/BL6-Mäusen intrazerebral hochreguliert. Die Ermittlung erfolgte durch RT-PCR und semiquantitative Analyse. 3 Mäuse je Zeitpunkt wurden untersucht.

3.3 Der Einfluss der neuronalen gp130-Expression auf den Verlauf der TE

3.3.1 Die neuronale gp130-Expression schützte vor einer letalen TE

Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse und Kontrolltiere wurden in 2 unabhängigen Experimenten mit 5 Zysten des DX-Stammes von *T. gondii* intraperitoneal infiziert. Es wurde das Überleben der Tiere in der akuten und chronischen Phase der Infektion verfolgt. Hier zeigte sich eine erhöhte Mortalität der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse in der chronischen Phase der TE. Während 70% der Kontrolltiere bis zum Tag 120 nach Infektion überlebten, starben 100% der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse bis zum 80. Infektionstag.

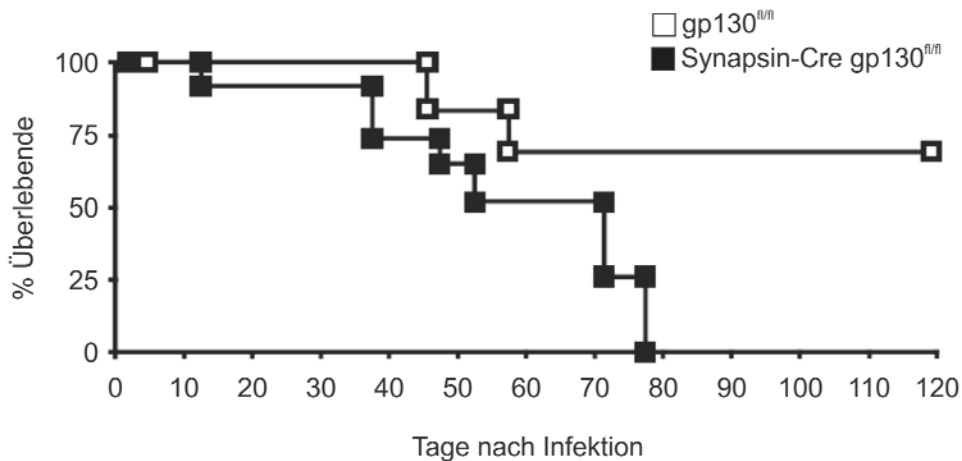


Abb. 9 Erhöhte Letalität der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse in der TE

Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse und gp130^{fl/fl} Kontrollen wurden i.p. mit *T. gondii* infiziert und das Überleben beobachtet. Die Überlebensfähigkeit der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse war gegenüber den Kontrolltieren signifikant reduziert ($p < 0,05$).

3.3.2 Verminderte Parasitenkontrolle im Gehirn von Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen

Zu verschiedenen Zeitpunkten im Stadium der chronischen TE wurden Proben zur Ermittlung der intrazerebralen Parasitenlast genommen. Real-time PCR-Analysen zeigten im Gehirn der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse signifikant mehr Parasiten-DNA als in den entsprechenden Kontrolltieren (Abb. 10A,B). Nach diesen Ergebnissen war es interessant herauszufinden, in welchen Entwicklungsstadien die Parasiten in den Gehirnen vorlagen. Histologische Analysen zeigten, dass sich in den Gehirnen der gp130^{fl/fl} Kontrollmäuse Zysten ausgebildet hatten, welche keine Nekrosen des

Hirngewebes verursachten. Im Gegensatz dazu fanden sich in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen sowohl Zysten, als auch freie Tachyzoiten, welche zur Entwicklung von Gewebsnekrosen führten (Abb. 10C,D).

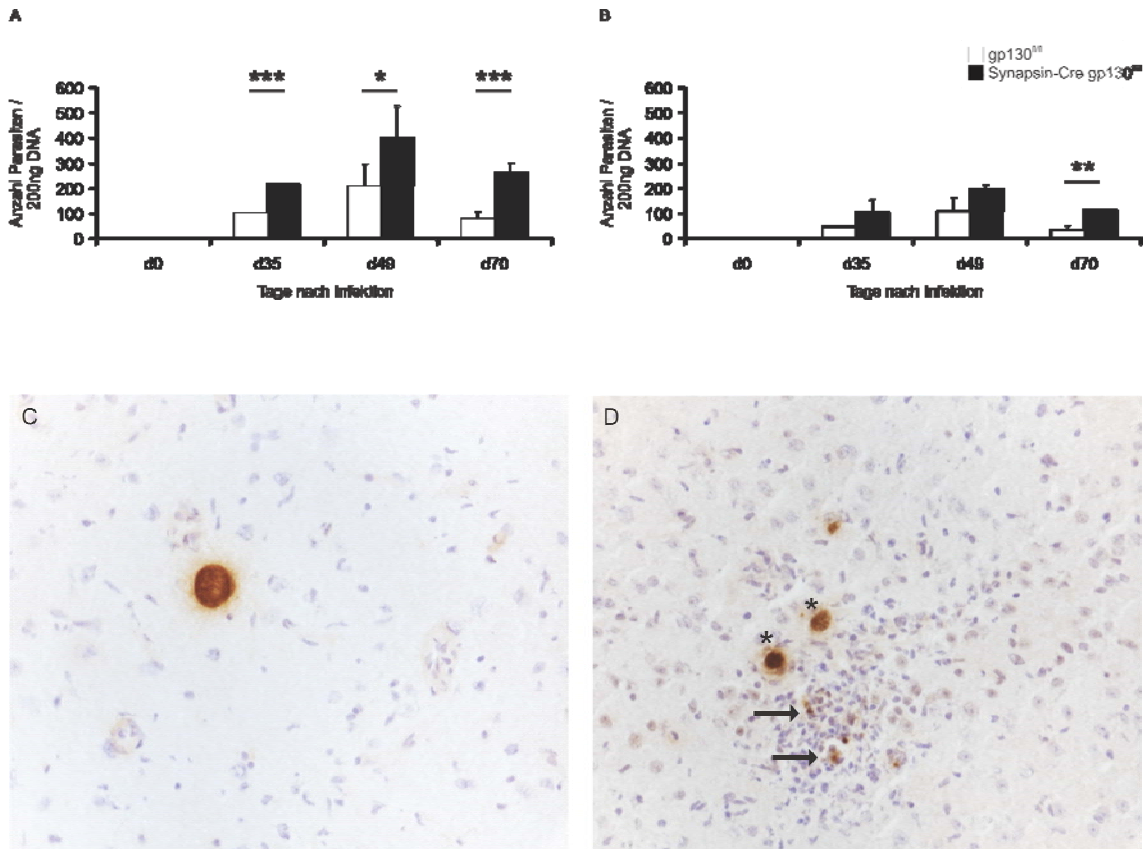


Abb. 10 Analyse der intrazerebralen Parasitenbelastung

Die intrazerebrale Parasitenlast wurde mittels RT-PCR quantifiziert. Als Standard wurde DNA aus *T. gondii*-Lysat eingesetzt. **A** Analyse des TgB1-Gens **B** Analyse des 529bp-Repeats **C** Am 70. Infektionstag waren nur einzelne *T. gondii*-Zysten bei Abwesenheit inflammatorischer Infiltrate im Kortex der gp130^{fl/fl} Tiere detektierbar. **D** Im Kortex der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse waren am Tag 70 nach Infektion häufig Zysten (Sterne) und freie Tachyzoiten (Pfeile) präsent. Diese waren mit inflammatorischen Infiltraten assoziiert. C und D An 6 Schnitten pro Gehirn wurden immunhistochemische Färbungen gegen *T. gondii* durchgeführt und die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. Jeweils 3 Mäuse wurden untersucht. Die Bilder zeigen und repräsentative Ergebnisse bei 400-facher Vergrößerung.

Durch die induzierbare Stickstoffoxid-Synthase (iNOS) wird NO gebildet, welches toxoplasmastatisch wirkt. Eine verminderte Expression von iNOS wurde daher als mögliche Ursache der gestörten Parasitenkontrolle vermutet. RT-PCR-Analysen ergaben jedoch, dass iNOS *in vivo* in beiden Gruppen gleichermaßen reguliert wurde (Abb. 11).

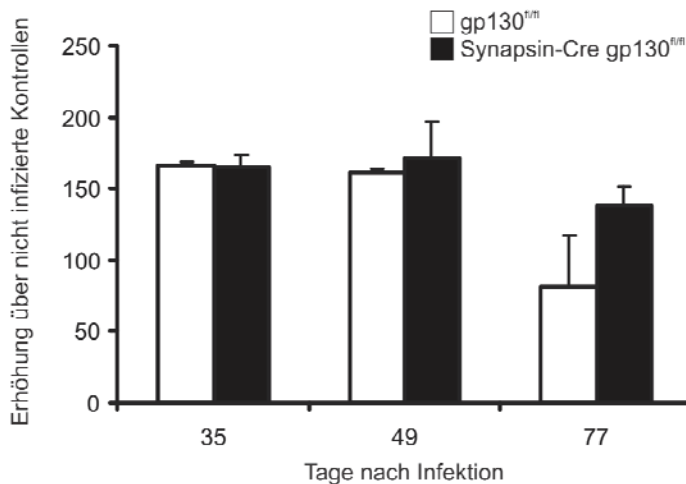


Abb. 11 Analyse der iNOS Expression

Die iNOS-Expression wurde an 3 verschiedenen Infektionstagen mittels RT-PCR untersucht. Die Transkription der iNOS mRNA war an allen untersuchten Tagen in gp130^{fl/fl} Mäusen und Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren gleich hoch. 3 Mäuse pro Gruppe und Zeitpunkt wurden analysiert.

3.3.3 Verstärkte Entzündungsreaktionen und dysregulierte Zytokinproduktion in Gehirnen der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse

Auf Grund der erhöhten Anzahl von Parasiten in den Gehirnen der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse, wurde eine dysregulierte Immunantwort vermutet, die zu dieser gestörten Parasitenkontrolle führte. Daher wurde die Entzündungsreaktion näher untersucht.

Am 49. Tag nach der Infektion konnten nur wenige CD45⁺ Leukozyten im zerebralen Kortex der gp130^{fl/fl} Mäuse nachgewiesen werden (Abb. 12A). Hingegen zeigten Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tiere eine schwere Enzephalitis mit perivaskulären Infiltraten und einer hohen Leukozytenzahl im gesamten Kortex (Abb. 12B).

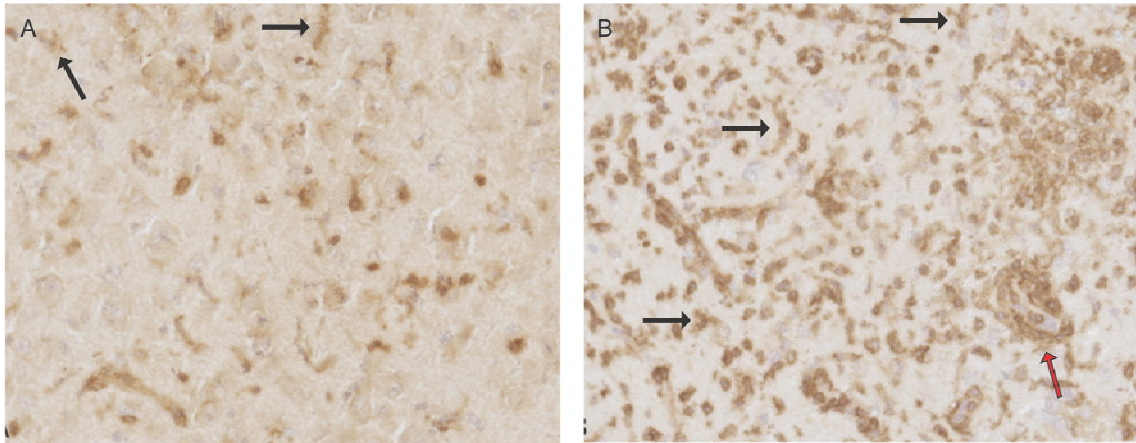


Abb. 12 intrazerebrale Hyperinflammation in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen

A Am 49. Infektionstag wurden geringe kortikale Leukozytenzahlen und stark CD45⁺ aktivierte Mikrogliazellen (Pfeile) im Gehirn von gp130^{fl/fl} Tieren gefunden. **B** In Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren wurden Zeichen einer schweren Enzephalitis mit einer hohen Zahl CD45⁺ Leukozyten im gesamten Kortex detektiert. Zusätzlich traten hohe Zahlen aktivierter Mikrogliazellen (schwarze Pfeile) und massive perivaskuläre Infiltrate (roter Pfeil) auf. A,B anti-CD45-Immunfärbung, mit Hämalaun gegengefärbt, 400-fache Vergrößerung

Um die Zahl der Entzündungszellen exakt zu quantifizieren, wurde am 49. Tag der Infektion eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. In den Hirnen der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse wurde ein Anstieg der Gesamtzahl inflammatorischer Leukozyten auf das 1,5-fache der Kontrolltiere detektiert. Die Analyse der Subtypen der infiltrierenden Leukozyten zeigte diese Erhöhung sowohl der CD4⁺ T-Zellen, als auch CD8⁺ T-Zellen, B220⁺ B-Zellen und CD11c⁺ CD45^{high} dendritischen Zellen (Abb. 13A,B). Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden hinsichtlich der Produktion der infektionsrelevanten Zytokine IFN- γ und IL-17 analysiert. Die Zahl IFN- γ -produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen jeweils dreimal höher als in den Kontrollmäusen (Abb. 13C). Die absolute Anzahl IL-17-produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war in den Hirnen der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse jeweils um das 1,5- bis 2-fache gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 13D). Damit stieg die Zahl der IFN- γ -produzierenden T-Zellen relativ zur Gesamtzahl der infiltrierenden T-Zellen deutlich an, während keine relative Erhöhung der IL-17-produzierenden T-Zellen erfolgte. Die Gesamtzahl IFN- γ -produzierender T-Zellen lag um zwei Zehnerpotenzen über der Gesamtzahl IL-17-produzierender T-Zellen. Zusätzlich zu den zytokinproduzierenden T-Zellen waren auch die absoluten und relativen Zahlen der regulatorischen Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen erhöht (Abb. 13E,F).

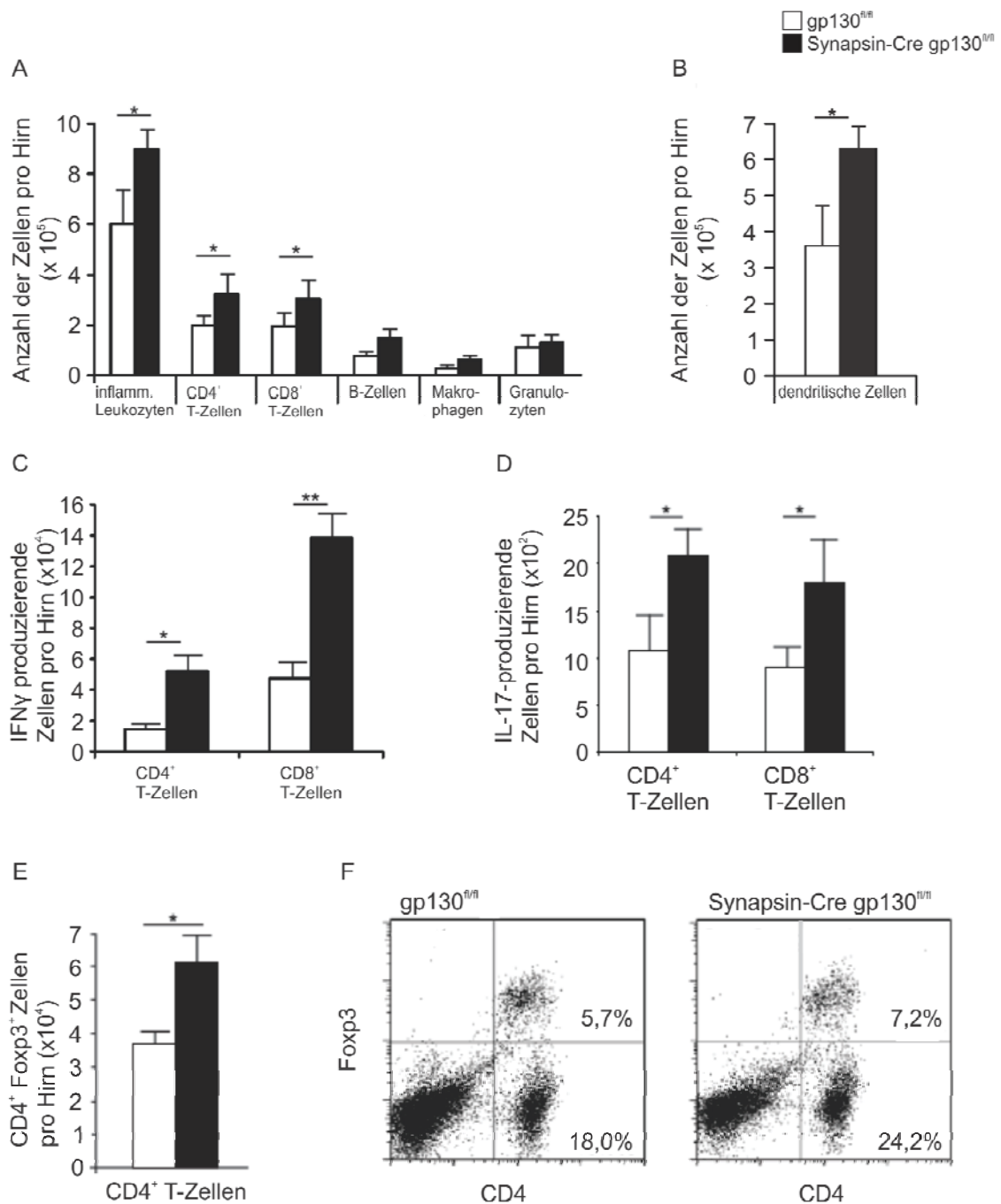


Abb 13 durchflusszytometrische Analyse der intrazerebralen Leukozyten am 49. Infektionstag
A,B Intrazerebrale Leukozyten wurden aus den Gehirnen der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tiere und gp130^{fl/fl} Kontrollen isoliert und die Zahl der inflammatorischen Leukozyten, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten (A) und dendritischen Zellen (B) analysiert. **C** Die Zahl IFN- γ -produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde ermittelt. **D** Analyse der Zahl IL-17-produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. **E,F** Die Zahl (E) und der prozentuale Anteil (F) Foxp3-produzierender CD4⁺ T-Zellen wurde ermittelt. Die Daten in A-E repräsentieren den Mittelwert \pm SD von 6 Mäusen pro Gruppe. F zeigt einen repräsentativen DotPlot eines von 3 untersuchten Tieren.

Der Untersuchung der Leukozytenpopulationen schloss sich die Analyse der Expression verschiedener intrazerebraler immunmodulatorischer Zytokine an. IL-27 ist ein Zytokin,

welches die Entwicklung IL-17-produzierender T-Helferzellen in entzündlichen Hirnerkrankungen negativ reguliert. Die Regulation des Zytokins wurde an den Tagen 35, 49 und 70 nach der Infektion auf mRNA-Ebene detektiert. Sowohl in gp130^{fl/fl} als auch in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen erfolgte eine vermehrte Transkription des IL-27 Gens, jedoch wurde IL-27 in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen an allen analysierten Tagen weniger hochreguliert als in den Kontrollen. Am 70. Infektionstag wurde in diesen Tieren eine signifikant geringere Menge mRNA detektiert (Abb. 14A). Um dies zu verifizieren, wurde am Tag 49 nach Infektion die IL-27-Expression auf Proteinebene mittels ELISA analysiert. Eine Erhöhung dieses Zytokins wurde sowohl in gp130^{fl/fl} als auch in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen am Infektionstag 49 detektiert. In guter Übereinstimmung mit den mRNA-Daten, wurde im Vergleich mit Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen eine doppelt so hohe IL-27-Konzentration im Hirnlysat der Kontrolltiere gefunden. (Abb. 14B).

Um den Beitrag der Neuronen zur Produktion von IL-27 bestimmen zu können, wurden primäre gp130-exprimierende und -defiziente Neuronen mit IL-6 stimuliert bzw. mit *T. gondii* infiziert und mit unbehandelten Neuronen verglichen. 24 h nach der Stimulation der Neuronen mit IL-6 wurde eine Ausschüttung von IL-27 in das Medium durch gp130 exprimierende Neuronen detektiert, während gp130-defiziente Neuronen kein IL-27 produzierten. Die Infektion mit *T. gondii* induzierte, unabhängig von der gp130-Expression, keine neuronale IL-27-Synthese (Abb. 14C).

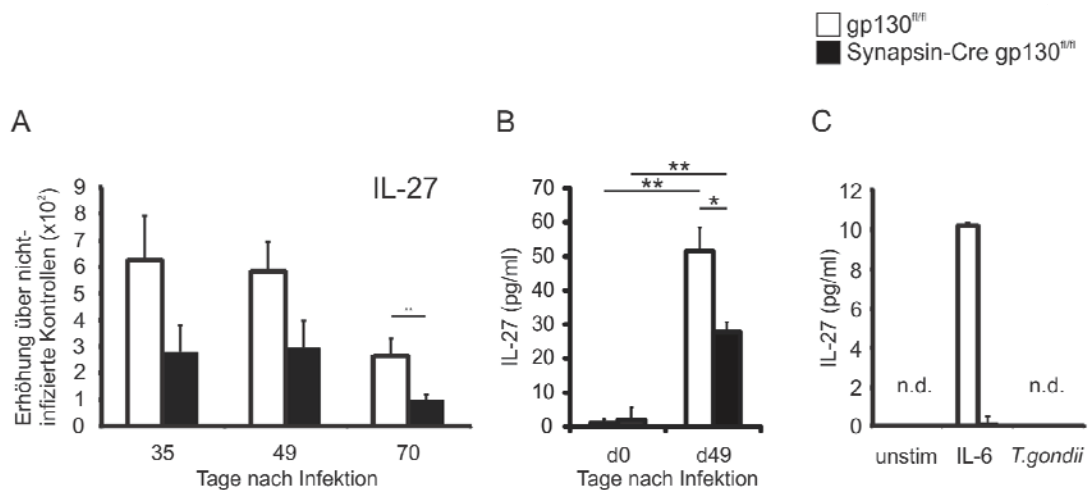


Abb. 14 Untersuchung der IL-27-Expression *in vivo* und *in vitro*

A An den Tagen 35, 49 und 70 nach der Infektion wurde die Menge der intrazerebralen IL-27 mRNA-Transkripte mittels RT-PCR ermittelt. **B** Die Expression des IL-27-Zytokins im Gehirn von Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren und gp130^{fl/fl} Kontrollen wurde in nicht infizierten Tieren und am Tag 49 nach Infektion mittels ELISA untersucht. **C** *in vitro* Analysen von gp130⁺ und gp130⁻ Neuronen mittels ELISA 24 h nach Stimulation mit IL-6 bzw. Infektion mit *T. gondii*. A-C 3 Mäuse pro Gruppe und Zeitpunkt wurden analysiert. (n.d. nicht detektierbar)

Weiterhin wurde die Produktion von intrazerebralem TGF-β analysiert, da dieses Zytokin ebenfalls anti-inflammatorische Wirkung besitzt. In nicht-infizierten Tieren

beider Gruppen konnte eine gleich starke Produktion von TGF-β1 und TGF-β2 festgestellt werden (Abb. 15A,B). Am Tag 49 nach Infektion war TGF-β1 in den Gehirnen der gp130^{fl/fl} Mäuse signifikant hochreguliert, während in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren keine Regulation stattfand. Damit war in infizierten Kontrolltieren TGF-β1 signifikant stärker exprimiert als in infizierten Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen (Abb. 15A). TGF-β2 wurde in beiden Gruppen durch die Infektion signifikant hochreguliert. Jedoch war diese Regulation in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen weniger stark ausgeprägt, so dass TGF-β2 am 49. Tag nach der Infektion in gp130^{fl/fl} Tieren signifikant stärker exprimiert war als in den Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen (Abb. 15B). Somit waren sowohl TGF-β1 als auch TGF-β2 signifikant weniger stark im Gehirn infizierter Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse exprimiert als in den Kontrolltieren.

Da auch Neuronen in der Lage sind, TGF-β zu synthetisieren, wurde untersucht, in welchem Umfang die Infektion mit *T. gondii* bzw. die Stimulation mit IL-6 die neuronale TGF-β Expression beeinflusst. *In vitro* war in unbehandelten Neuronen beider Genotypen eine geringe basale TGF-β-Produktion detektierbar. Nach 24-stündiger Stimulation der Neuronen mit IL-6 wurden sowohl aktives als auch inaktives TGF-β in gp130 exprimierenden Neuronen hochreguliert, während keine Veränderung in gp130-defizienten Neuronen detektierbar war. Die Infektion der Neuronenkulturen mit *T. gondii* führte zu einer vermehrten Synthese von inaktivem, jedoch nicht von aktivem TGF-β in gp130-exprimierenden Neuronen, während die Infektion gp130 defizienter Neuronen keine Änderung der TGF-β-Expression verglichen mit unbehandelten Kontrollen herbeiführte (Abb. 15C).

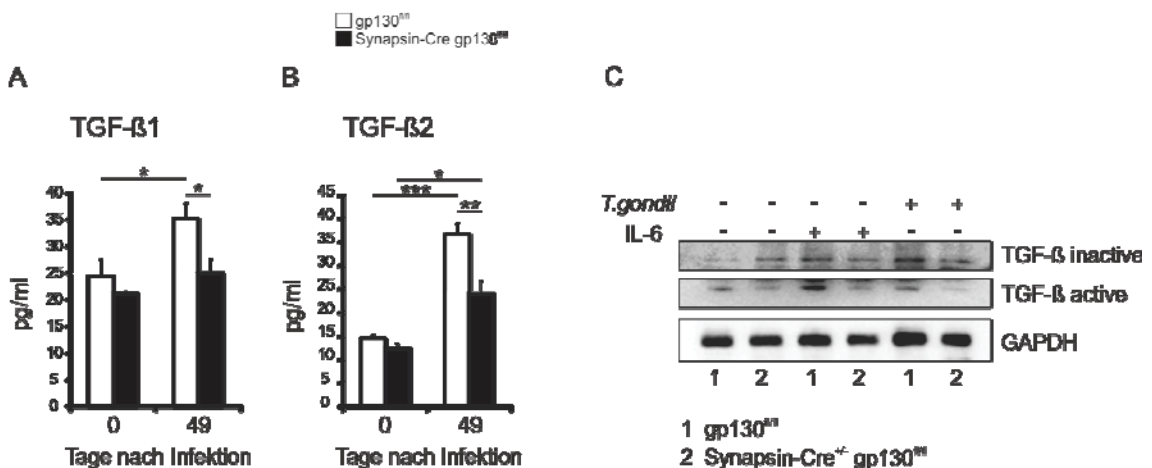


Abb. 15 Untersuchung der TGF-β-Expression

A,B Die intrazerebrale TGF-β1 (A) und TGF-β2 (B) Expression von Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren und gp130^{fl/fl} Kontrollen wurde in nicht infizierten Tieren und am Tag 49 nach Infektion mittels ELISA untersucht. **C** *in vitro* Analysen von gp130⁺ und gp130⁻ Neuronen mittels Western Blot 24h nach Stimulation mit IL-6 bzw. Infektion mit *T. gondii*. A,B 3 Mäuse pro Gruppe und Zeitpunkt wurden untersucht

3.3.4 Die neuronale gp130 Expression verhinderte einen Neuronenverlust bei der TE

Über einen Infektionszeitraum von 70 Tagen wurden histologische Untersuchungen der infizierten Gehirne durchgeführt. Bereits am 35. Tag nach der Infektion fand sich ein geringer Verlust kortikaler Neuronen innerhalb der Entzündungsbereiche in gp130^{fl/fl} Mäusen (Abb. 16A) und in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen innerhalb und in der Nähe der entzündeten Areale (Abb. 16B,C). Während jedoch in den Hirnen der Kontrollmäuse im Verlauf der Erkrankung nur ein sehr milder Verlust an Nervenzellen innerhalb der Entzündungsherde erkennbar war, verloren Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse deutlich mehr Neuronen innerhalb von Arealen mit einer Entzündungsreaktion und auch in Bereichen, in denen keine Leukozyteninfiltrate nachweisbar waren. Dies führte zu einem drastischen Neuronenverlust im chronischen Stadium der TE. Am 70. Infektionstag war der Kortex der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse bereits sehr schwer geschädigt. Es wurden ausgedehnte Areale mit stark dezimierter Neuronendichte detektiert. Diese Bereiche waren sowohl mit Entzündungsarealen assoziiert (Abb. 16E), als auch frei von inflammatorischen Infiltraten (Abb. 16F). Im Gegensatz dazu zeigte sich nur ein sehr milder, nicht progressiver Nervenzellverlust in den Kontrollmäusen (Abb. 16D).

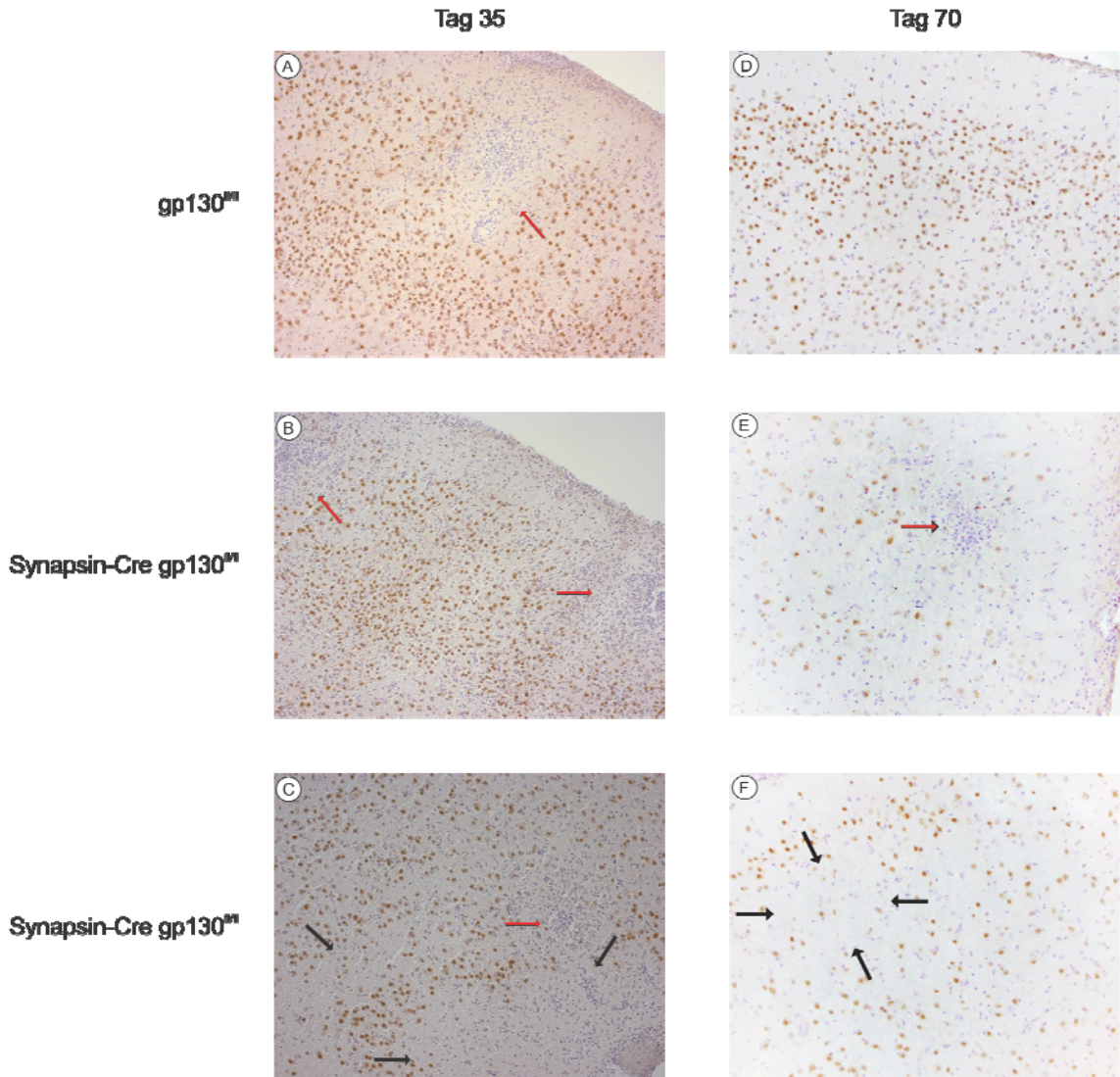


Abb. 16 Immunhistochemische Färbung kortikaler Neuronen

A Am 35. Tag nach der Infektion mit *T. gondii* wurden im Kortex der gp130^{fl/fl} Mäuse gut abgegrenzte inflammatorische Infiltrate gefunden. B,C In Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen waren die Entzündungsherde weniger gut begrenzt (B) und es trat ein Verlust von Neuronen auch außerhalb der Regionen mit inflammatorischen Infiltraten auf (C). D Am 70. Tag nach Infektion war in den Kontrollmäusen die Architektur des frontalen Neokortex nicht verändert, ein Neuronenverlust oder eine andauernde Entzündungsreaktion waren nicht erkennbar. E,F Der frontale Kortex der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse zeigte am 70. Infektionstag einen deutlichen Neuronenverlust und eine aktive Entzündungsreaktion mit starken Leukozyteninfiltraten (Pfeil zeigt inflammatorische Region mit Neuronenverlust) (E). In Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren wurde auch ein Verlust von Neuronen in allen kortikalen Schichten außerhalb der Bereiche mit aktiver Entzündung gefunden (innerhalb des durch Pfeile markierten Bereiches) (F). A-F anti-NeuN-Immunfärbung, mit Hämalaun gegengefärbt, die roten Pfeile weisen auf inflammatorische Infiltrate, die schwarzen Pfeile deuten auf Bereiche mit Neuronenverlust A-C 100-fache Vergrößerung, D-F 200-fache Vergrößerung

Im Gegensatz zu den erheblichen Neuronenverlusten in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen konnten keine Veränderungen bei Astrozyten und Mikrogliazellen detektiert werden. Sowohl in gp130^{fl/fl} als auch in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen wurden beide Zelltypen gleichermaßen aktiviert und es fand sich kein Verlust dieser Zellpopulationen. GFAP-

Färbungen zeigten eine gleich starke Aktivierung der für die Eingrenzung der Entzündung wichtigen Astrozyten in beiden Gruppen. Auch die Mikrogliazellen wiesen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer F4/80- und der MHC Klasse-II- Expression auf. Somit haben diese Zelltypen keinen entscheidenden Einfluss auf den histologisch beobachteten Zelltod.

3.3.5 Die gp130 Expression kultivierter Neuronen schützte vor einer *T. gondii* induzierten Apoptose *in vitro*

Um die Frage zu beantworten, ob die Parasiten direkt für den Zelltod der Neuronen verantwortlich sind, wurden gp130-exprimierende und gp130-defiziente Neuronen kultiviert und mit *T. gondii* infiziert. Das Ausmaß des Zelltodes wurde ermittelt, indem die von geschädigten Zellen freigesetzte LDH bestimmt wurde. Im nicht infizierten Versuchsansatz zeigten beide Gruppen eine sehr geringe spontane LDH-Freisetzung. Wurden die Zellen mit *T. gondii* infiziert, erhöhte sich die LDH-Freisetzung in beiden Versuchsgruppen. Die LDH-Freisetzung aus gp130- Neuronen lag jedoch signifikant über der der Kontrollen. Daraus wurde ersichtlich, dass in den gp130-defizienten Zellkulturen signifikant mehr Zellen durch die Infektion zugrunde gingen als in den Kontrollen (Abb. 17A). Entsprechend konnte geschlossen werden, dass das Vorhandensein von membranverankertem gp130 ein wichtiger Faktor für das Überleben der Nervenzellen bei der *Toxoplasma*-Infektion ist.

Um herauszufinden, welches der über gp130 wirkenden Zytokine potentiell einen Schutz vor *T. gondii*-induziertem Zelltod vermittelt, wurden die Zellen infiziert und mit Zytokinen der IL-6 Familie stimuliert. Mittels LDH-Assay wurde die Protektion der Stimulation vor der Behandlung bestimmt. Die Infektion der stimulierten Zellen führte zu keiner Veränderung der Zytotoxizität in den gp130-defizienten Neuronenkulturen verglichen mit den nicht-stimulierten Zellen. Hingegen konnten alle eingesetzten IL-6 Zytokine den durch die Infektion hervorgerufenen Zelltod der gp130⁺ Neuronen signifikant reduzieren und somit zum Schutz der Zellen beitragen. Die Stimulation der infizierten Neuronen mit IFN- γ oder TNF- α führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Reduktion des Zelltodes verglichen mit den unstimulierten infizierten Neuronen des gleichen Genotyps. Hier wurden keine Unterschiede zwischen gp130-exprimierenden und gp130-defizienten Nervenzellen festgestellt (Abb. 17A). Die Zugabe der Zytokine zu nicht-infizierten Zellen hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen.

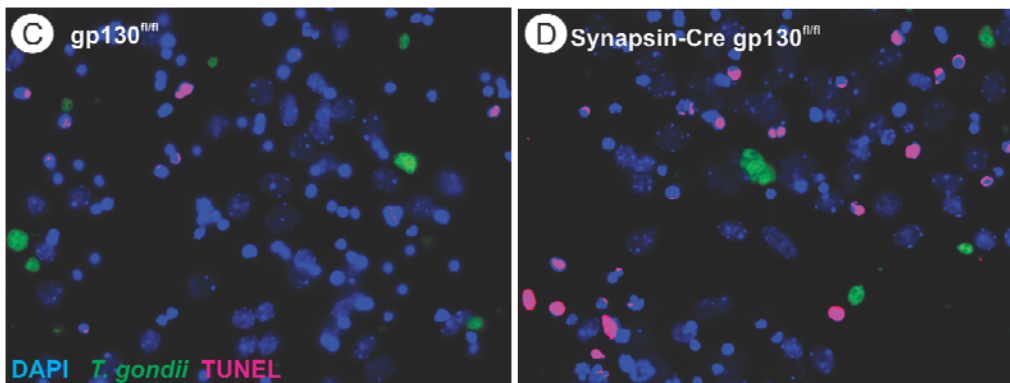
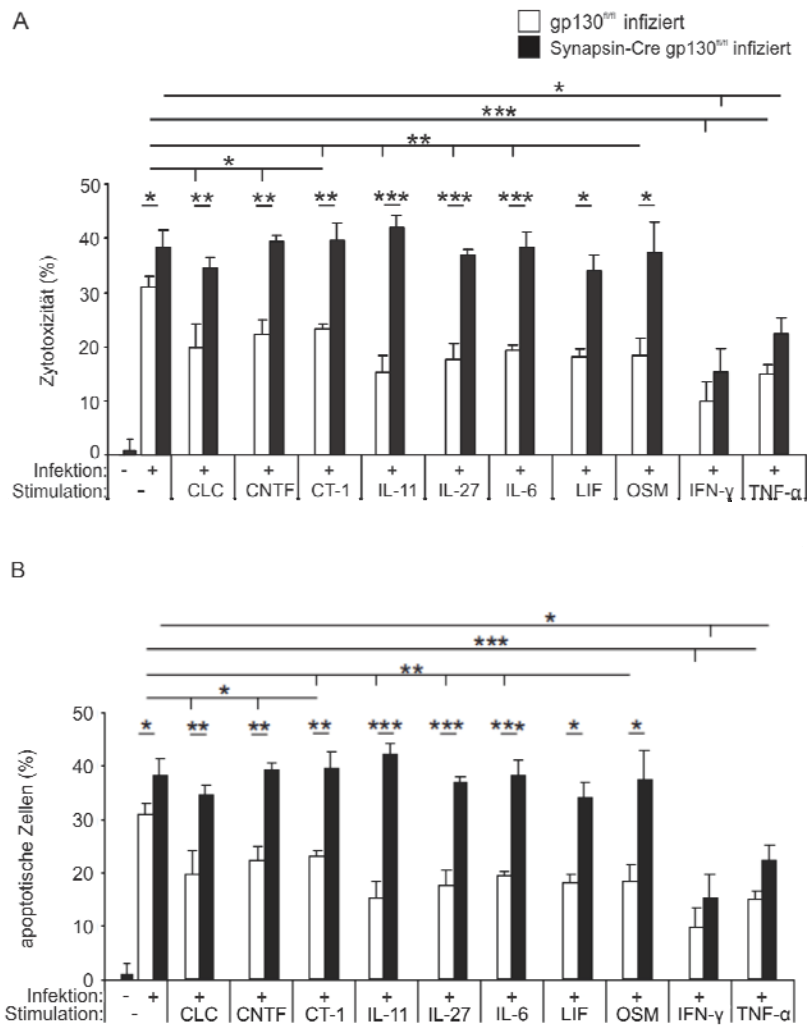


Abb. 17 Erhöhte Zelltodrate und Apoptose in *T. gondii* infizierten gp130-defizienten Neuronen
A,B Nicht infizierte und infizierte kultivierte Neuronen wurden mit den angegebenen Zytokinen stimuliert. Als Indikator des Zelltodes wurde die LDH-Freisetzung aus geschädigten Zellen photometrisch bestimmt (A). Die Zahl TUNEL⁺ apoptotischer Zellen wurde mikroskopisch bestimmt. Mindestens 100 Zellen pro Gruppe wurden analysiert. **A,B** Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SD von 6 Mäusen pro Gruppe in 2 unabhängigen Experimenten. **C,D** Immunzytochemische Färbungen infizierter gp130-exprimierender (C) und gp130-defizienter Neuronen (D) *in vitro*. 40-fache Vergrößerung

TUNEL-Färbungen der unbehandelten und stimulierten infizierten Kulturen zeigten, dass *T. gondii* sowohl in gp130⁺, als auch in gp130⁻ Neuronen den apoptotischen Zelltod induziert. Die IL-6 Zytokine waren in der Lage, die Apoptoserate der infizierten gp130⁺ Neuronen signifikant zu reduzieren, während die Apoptose der infizierten gp130⁻ Neuronen nicht durch die Zytokine der IL-6 Familie beeinflusst wurde. IFN- γ und TNF- α konnten die Apoptoserate in beiden Gruppen signifikant reduzieren (Abb. 17B). Diese Ergebnisse spiegelten die Resultate der LDH-Messungen wider und zeigten, dass der detektierte Zelltod auf einer Apoptose beruhte.

Um zu analysieren, ob die infizierten oder nicht-infizierten Neuronen apoptotisch wurden, wurden kombinierte TUNEL- *T. gondii*-Färbungen durchgeführt. Die Auswertung der Bilder belegte, dass infizierte Neuronen beider Gruppen vor Apoptose geschützt waren, während benachbarte nicht-infizierte Zellen apoptotisch wurden (Abb. 17C,D).

3.3.6 Einfluss der neuronalen gp130 Expression auf die Invasion und Replikation des Parasiten *in vitro*

Aus den *in vivo*-Experimenten war bekannt, dass in Gehirnen der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse signifikant mehr intrazerebrale *Toxoplasmen* detektierbar waren, als bei den Kontrolltieren. Um den Einfluss des neuronal exprimierten gp130 auf die Reduktion der Parasitenzahl zu analysieren, wurden gp130-exprimierende und -defiziente Neuronen mit IL-6 Zytokinen bzw. IFN- γ oder TNF- α stimuliert und infiziert. Nach 24 h wurden die Zahl der intraneuronalen Vakuolen und die Zahl der in den parasitophoren Vakuolen befindlichen Parasiten ermittelt. Hinsichtlich der Invasion und der Replikation der Parasiten zeigten diese Experimenten keine Unterschiede zwischen den gp130⁺ und gp130⁻ Neuronen und den unterschiedlichen Stimulationen (Abb. 18 A,B).

Neuronales gp130 bei der TE ist wichtig für das Überleben der infizierten Tiere. Der Verlust von gp130 auf Neuronen führte während der Infektion mit *T. gondii* zu einer verstärkten Apoptose dieser Zellen *in vivo* und *in vitro*. Weiterhin rekrutierten Mäuse mit einer konditionalen neuronalen Deletion der gp130-Rezeptoruntereinheit mehr Leukozyten in das Gehirn. Dies führte zu einer Erhöhung der Zahl intrazerebraler IFN- γ - und IL-17-produzierender T-Zellen. Gleichzeitig wird weniger anti-inflammatorisches IL-27 und TGF- β synthetisiert. Als Konsequenz starben aufgrund einer dysregulierten Immunantwort und eines massiven Neuronenverlustes im chronischen Stadium der TE die Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse signifikant früher als die gp130^{fl/fl} Kontrolltiere.

Um zu untersuchen, ob auch eine astrozytäre gp130-Expression eine wichtige Rolle in der TE spielt, wurden Mäuse untersucht, welche kein gp130 auf Astrozyten exprimierten.

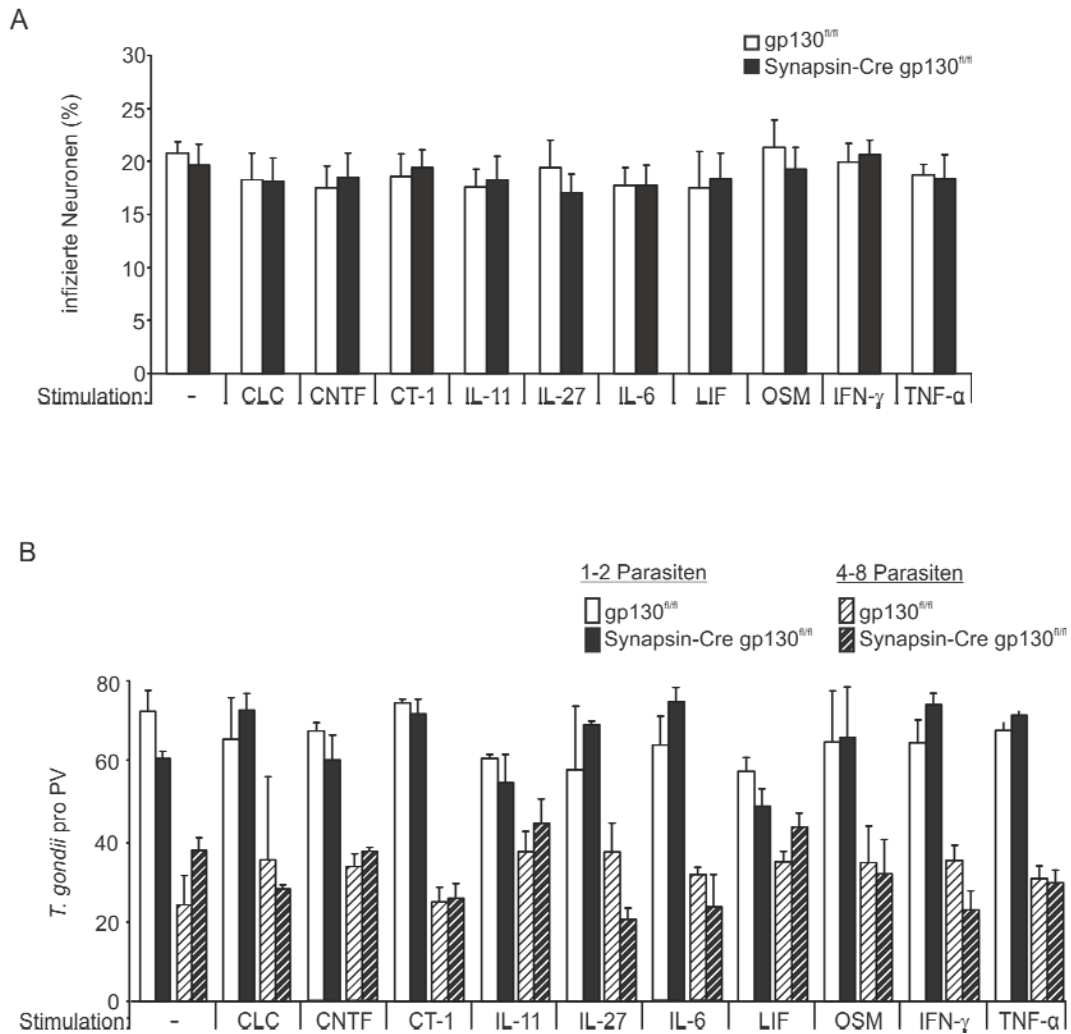


Abb. 18 Invasion von *T. gondii* in die Neuronen und intraneuronale Replikation

gp130⁺ und gp130⁻ Neuronen wurden kultiviert, mit den angegebenen Zytokinen stimuliert und für 24h infiziert. **A,B** Die Invasion in die Neuronen (A) und die intraneuronale Replikation (B) der Parasiten wurde in Abhängigkeit von der Stimulation mikroskopisch ermittelt.

3.4 Der Einfluss der astrozytären gp130-Expression auf den Verlauf der TE

3.4.1 Die astrozytäre gp130-Expression schützte vor einem letalen Verlauf der TE

Gp130^{fl/fl} Mäuse und hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere wurden mit 5 Zysten des DX-Stammes von *T. gondii* intraperitoneal infiziert und das Überleben der Versuchstiere beobachtet. Bis zum 40. Infektionstag starben 90% der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse und kein Tier überlebte den 50. Tag nach der Infektion. Hingegen starben nur 25% der Kontrolltiere bis zum 40. Tag und 50% der Kontrollen überlebten bis zum Abbruch des Experiments am 80. Infektionstag (Abb. 19).

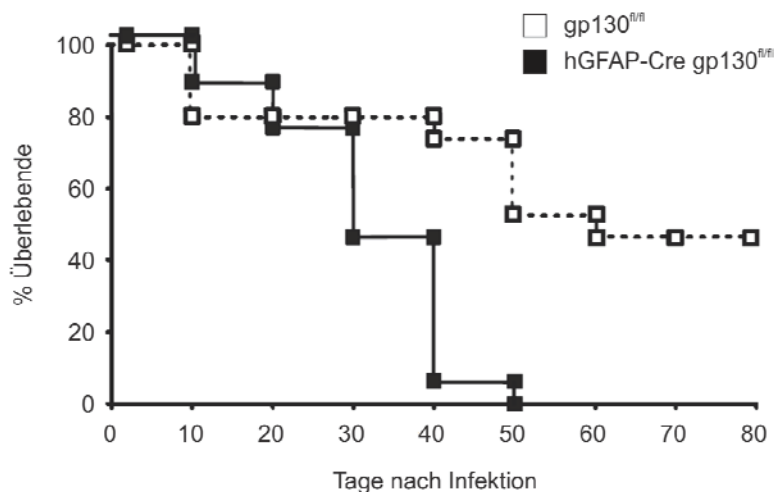


Abb. 19 Reduzierte Überlebensfähigkeit der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse in der TE

hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse und gp130^{fl/fl} Kontrollen wurden i.p. mit *T. gondii* infiziert und das Überleben wurde beobachtet. Eine signifikant erhöhte Letalität der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse wurde beobachtet ($p < 0.01$).

3.4.2 Die erhöhte Letalität der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere ging mit einer gestörten Parasitenkontrolle einher

Um die Ursache für die verminderte Überlebensrate *T. gondii* infizierter hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere zu ermitteln, wurden immunhistochemische Studien durchgeführt. Die Analyse der intrazerebralen Parasitenzahlen zeigte, dass diese Tiere nicht in der Lage waren, die Vermehrung der Parasiten einzudämmen (Abb. 20A,B). Bereits 14 Tage nach der Infektion wurden in immunhistochemischen Proben der Gehirne infizierter hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse signifikant mehr Zysten und Tachyzoiten gefunden als in

den Kontrolltieren. Auch am 35. Infektionstag war die Zahl freier Tachyzoiten in den Gehirnen der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere signifikant erhöht, die Zystenanzahl blieb ebenfalls über der des Kontrollniveaus (Abb. 20C).

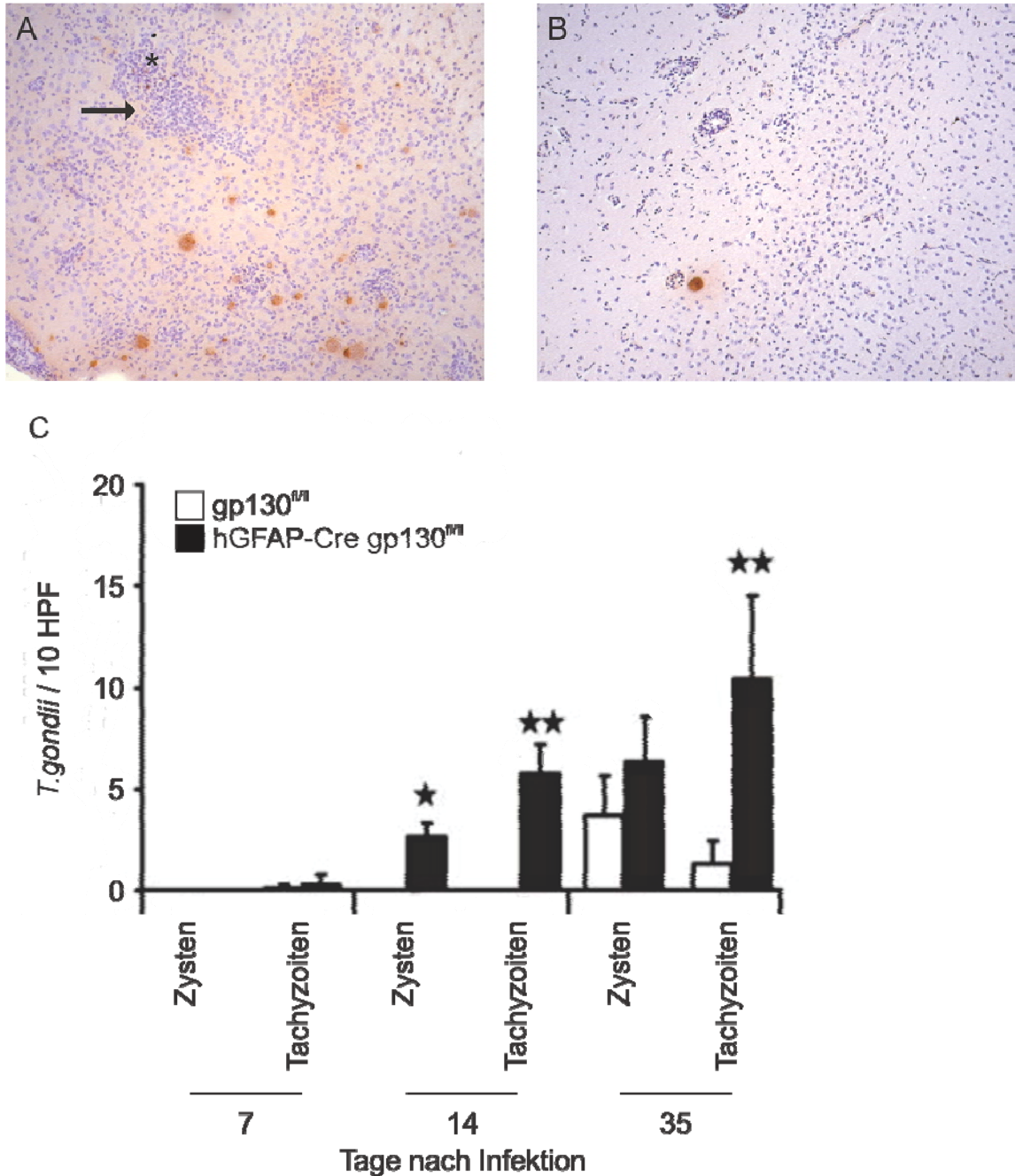


Abb. 20 Erhöhte Parasitenbelastung in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen

A In histologischen Schnitten wurde eine stark erhöhte Zahl intrakortikaler Zysten und Tachyzoiten gefunden, die zum Teil mit Gewebsnekrosen (Pfeil) und *Toxoplasma*-Antigenen (Stern) assoziiert waren. **B** In gp130^{fl/fl} Mäusen war die Zahl der Zysten gering. Nekrosen des Hirnparenchyms wurden nicht gefunden. **A,B** 35. Infektionstag, anti-*Toxoplasma*-Immunfärbung, mit Hämalaun gegengefärbt, 100-fache Vergrößerung **C** Die Quantifizierung der intrazerebralen Parasitenbelastung erfolgte durch Zählung BAG1⁺ Zysten und SAG1⁺ Tachyzoiten in 100 Gesichtsfeldern (HPF). Der Mittelwert ± SD ist gezeigt.

Die Eindämmung der Parasitenreplikation in Astrozyten hängt entscheidend von der IGTP-Expression ab (Martens et al., 2005; Melzer et al., 2008), so dass vermutet wurde, dass IGTP-Expressionsveränderungen zur erhöhten Parasitenlast in den Gehirnen der hGFAP-gp130^{fl/fl} Tiere beitragen könnten. Zu drei Zeitpunkten der Infektion wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass die erhöhte Parasitenbelastung der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere sogar mit einem Anstieg des IGTP-Spiegels einherging, so dass die gestörte Parasitenkontrolle nicht durch fehlendes IGTP verursacht wurde (Abb. 21).

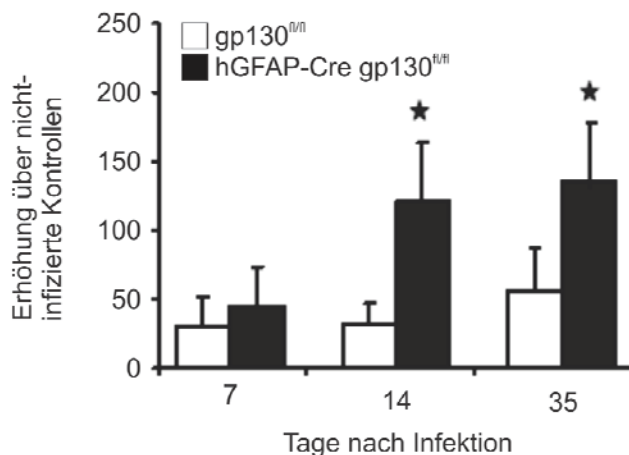


Abb. 21 Hochregulation von IGTP

7, 14 und 35 Tage nach der Infektion wurde die IGTP-Expression mittels RT-PCR analysiert. 3 Mäuse pro Gruppe und Zeitpunkt wurden analysiert und der Mittelwert \pm SD ist angegeben.

3.4.3 Verlust von Astrozyten in *T. gondii*-infizierten hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen

Nicht-infizierte hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere zeigten an 3 untersuchten Zeitpunkten (6 Wochen, 6 Monate, 12 Monate) keine Veränderungen hinsichtlich der Morphologie und Zahl der Astrozyten, verglichen mit gleichaltrigen gp130^{fl/fl} Mäusen des selben Wurfes.

Die Infektion der gp130^{fl/fl} Kontrolltiere mit *T. gondii* führte zu einem Anstieg der Astrozytenzahl in der Nähe der Entzündungsbereiche bereits am 21. Infektionstag. Mit Fortdauer der Infektion erhöhte sich die Zahl der Astrozyten weiter. Während gp130^{fl/fl} Mäuse diese Astroglieose entwickelten, trat keine Erhöhung der Astrozytenzahl innerhalb der Entzündungsherde in den Gehirnen der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere bis zum 35. Infektionstag auf. Die Zahl der Astrozyten innerhalb der entzündeten Areale war in den hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen bereits am 21. und auch am 35. Infektionstag signifikant geringer als in den gp130^{fl/fl} Kontrollen. Interessanterweise entwickelten

auch die hGFAP-Cre $gp130^{fl/fl}$ Mäuse außerhalb der Entzündungsareale eine mit den Kontrollen vergleichbare Astrogliose (Abb. 22).

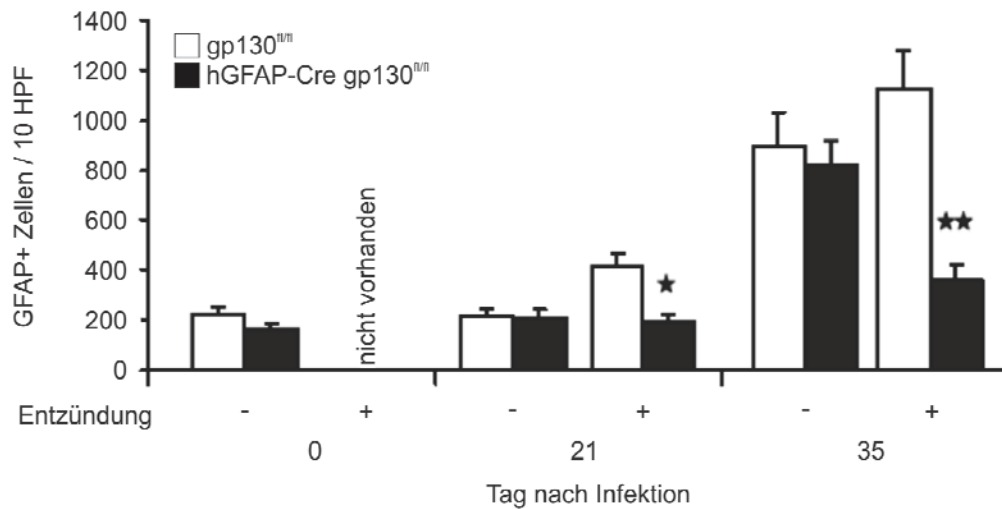


Abb. 22 Quantifizierung der Astrozyten in $gp130^{fl/fl}$ und hGFAP-Cre $gp130^{fl/fl}$ Mäusen

Die Zahl der Astrozyten innerhalb und außerhalb der Entzündungsbereiche wurde mikroskopisch ermittelt. 100 Gesichtsfelder von je 3 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt wurden analysiert, die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD.

In $gp130^{fl/fl}$ Mäusen waren die Astrozyten am 35. Infektionstag stark aktiviert und hypertroph sowohl in der Nähe der entzündeten Areale (Abb. 23A) als auch perivaskulär (Abb. 23B). Innerhalb der entzündeten Bereiche war die Zahl GFAP⁺ Astrozyten gering (Abb. 23C). Bereits am 21. Tag und noch weiter verstärkt am 35. Tag nach der Infektion befanden sich in hGFAP-Cre $gp130^{fl/fl}$ Mäusen um die Entzündungsbereiche (Abb. 23D) und perivaskulär (Abb. 23E) nur noch einzelne Astrozyten mit verkümmerten Fortsätzen und kondensierten Zellkernen, die auf ein apoptotisches Geschehen hinwiesen. Eine den Kontrolltieren vergleichbare Astrogliose innerhalb und in der Nähe der entzündeten Bereiche konnte nicht detektiert werden (Abb. 23F).

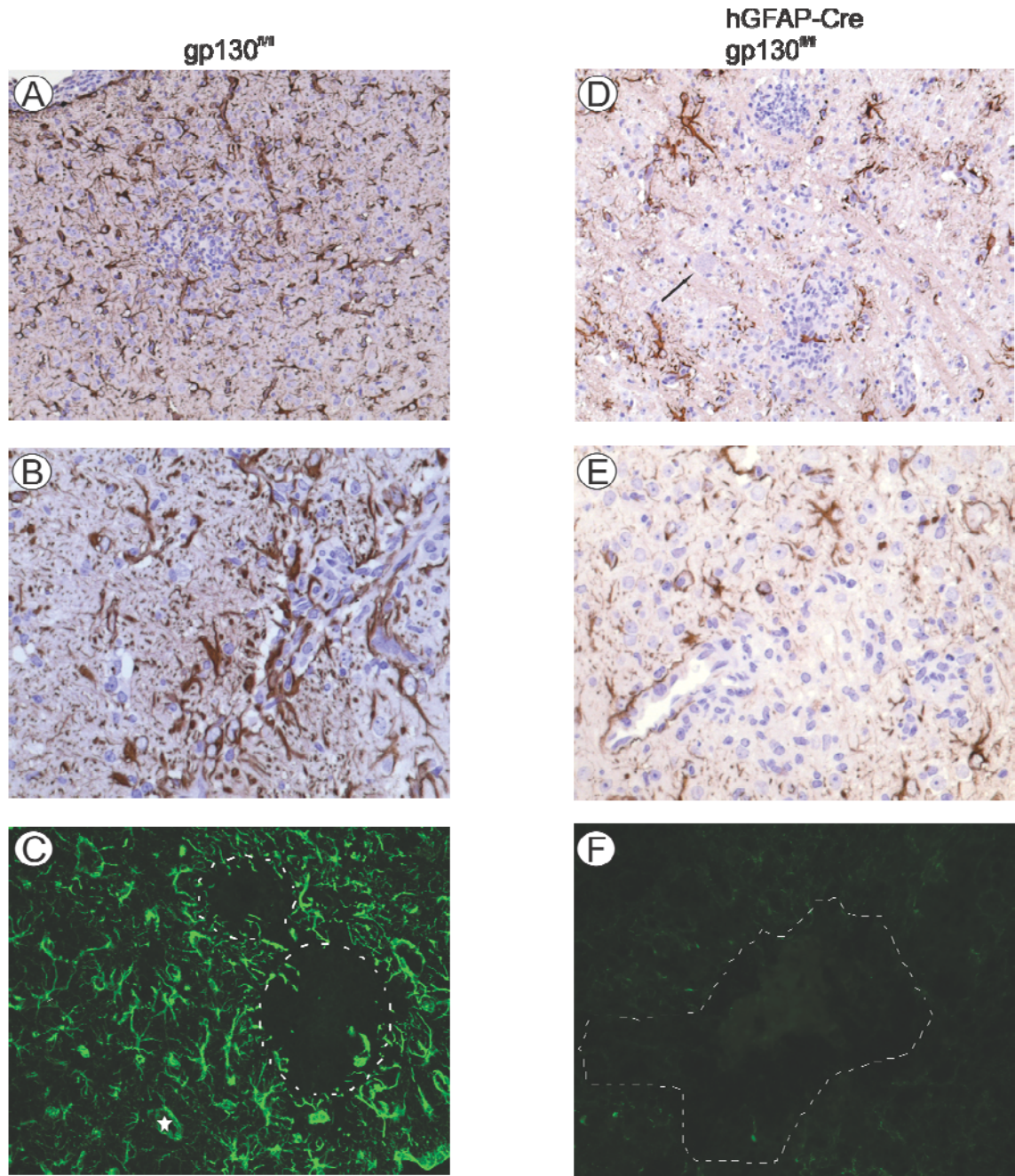


Abb. 23 Histologische Darstellung der Astrozyten in infizierten $gp130^{fl/fl}$ und $hGFAP-Cre\ gp130^{fl/fl}$ Mäusen

A-C $gp130^{fl/fl}$ Mäuse: GFAP-Färbungen zeigten aktivierte kortikale (A) und perivaskuläre (B) Astrozyten. Eine Astrogliose wurde in der Nähe der entzündeten Bereiche detektiert, während innerhalb der inflammatorischen Läsionen die Zahl der Astrozyten stark reduziert war. (C); **D-E** $hGFAP-Cre\ gp130^{fl/fl}$ Mäuse: Im Gegensatz zu den Kontrollen waren die Astrozytenzahlen im Hirnparenchym (D) und perivaskulär (E) stark vermindert. Um die inflammatorischen Areale befanden sich keine aktivierten Astrozyten. Der Pfeil in D weist auf eine *T. gondii* Zyste, die nicht mit aktivierten Astrozyten assoziiert ist. A,B,D,E 35. Infektionstag, anti-GFAP-Immunfärbung, mit Hämalaun gegengefärbt, 100-fache Vergrößerung (A,D), 200-fache Vergrößerung (B,E); C,F 35. Infektionstag, anti-GFAP-Immunfluoreszenzfärbung (grün), 200-fache Vergrößerung, Belichtung 900ms (C) und 2000ms (F), Die weiß umrandeten Bereiche umschließen inflammatorische Infiltrate

Um den Astrozytenverlust weiterhin zu dokumentieren, wurden auch Färbungen gegen S100, einem Kalzium-bindenden Protein von Astrozyten, Oligodendrozyten und Makrophagen, durchgeführt. Wie in Abb. 24 dargestellt, waren sowohl die Astrogliose bei den $gp130^{fl/fl}$ Tieren (Abb. 24A), wie auch der Verlust von Astrozyten in den *T. gondii* infizierten hGFAP-Cre $gp130^{fl/fl}$ Mäusen (Abb. 24B) mit dieser Färbung ebenfalls nachweisbar.

Neuronen waren von dieser Pathologie nicht betroffen, so dass in *T. gondii* infizierten hGFAP-Cre $gp130^{fl/fl}$ Mäuse und den Kontrolltieren die Zahl der NeuN⁺ Neuronen keinen Unterschied aufwies (Abb. 24 C,D).

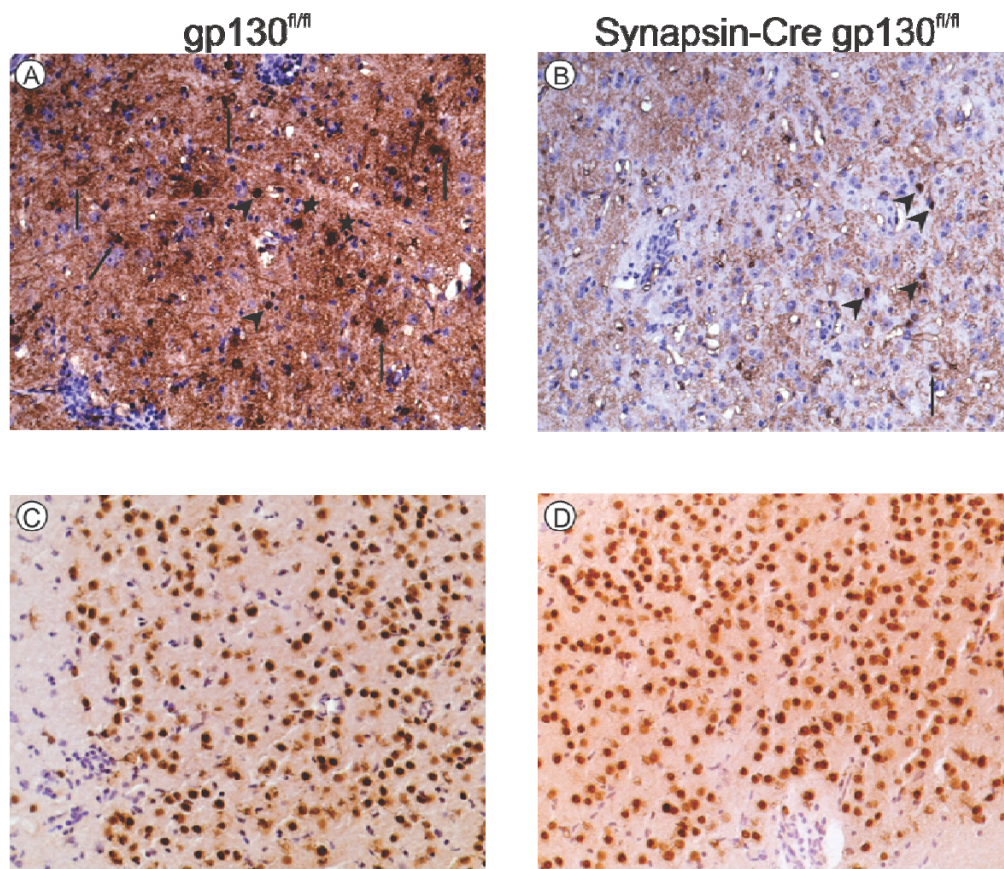


Abb. 24 Histologische Darstellung der S100⁺ Zellen und Neuronen in $gp130^{fl/fl}$ und hGFAP-Cre $gp130^{fl/fl}$ Mäusen

A,B S100⁺ Zellen sind stark reduziert in hGFAP-Cre $gp130^{fl/fl}$ Mäusen (B) im Vergleich mit den Kontrollen (A). Die Pfeile markieren Astrozyten, die Pfeilköpfe Oligodendrozyten, die Sterne Makrophagen. **C,D** In Zahl und Morphologie der Neuronen in infizierten $gp130^{fl/fl}$ Mäusen (C) und hGFAP-Cre $gp130^{fl/fl}$ Mäusen (D) zeigten sich keine Unterschiede; A,B 35. Infektionstag, anti-S100-Immunfärbung, mit Hämalaun gegengefärbt, 100-fache Vergrößerung C,D 35. Infektionstag, anti-NeuN-Immunfärbung, mit Hämalaun gegengefärbt, 100-fache Vergrößerung

3.4.4 Einfluss des Astrozytenverlustes auf die Zytokinexpression

Astrozyten sind eine Quelle wichtiger Zytokine und Chemokine in der Immunantwort der *T. gondii* Infektion. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der Verlust von Astrozyten in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren ein verändertes Zytokin- und Chemokinexpressionsmuster verursachte.

IFN- γ ist das wichtigste protektive Zytokin bei der TE. Verglichen mit den Kontrolltieren konnte in durchflusszytometrischen Analysen eine etwa doppelt so hohe IFN- γ -Produktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen detektiert werden (Abb. 25A). Mittels RT-PCR wurde am 7. Infektionstag eine gleichmäßige Erhöhung der Menge an IFN- γ mRNA gemessen. Am 14. und 35. Infektionstag stieg die Menge der IFN- γ mRNA in den Hirnen der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse weiter an, während sie in den Kontrollen unverändert blieb (Abb. 25B).

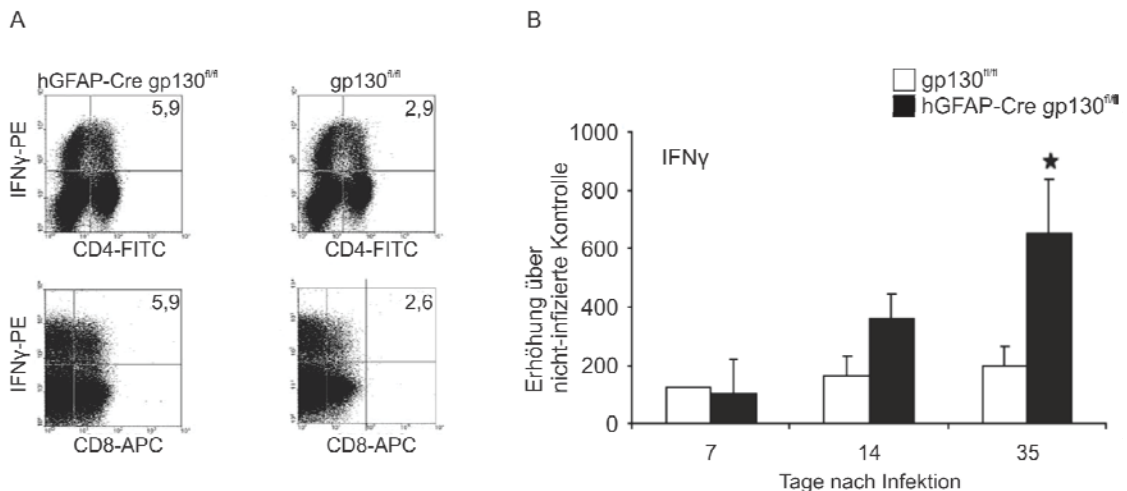


Abb. 25 Erhöhte intrazerebrale IFN- γ -Produktion in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen

A intrazelluläre IFN- γ -Färbung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen *T. gondii* infizierter hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} und gp130^{fl/fl} Mäuse; Angaben der IFN- γ ⁺ CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen in %, Gehirne von 3 Mäusen pro Gruppe wurden zusammengeführt und durchflusszytometrisch analysiert **B** IFN- γ Expressionsanalyse mittels RT-PCR, 3 Mäuse pro Gruppe wurden analysiert und die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SD

Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) und CXCL-10 sind Zytokine, die während einer TE hauptsächlich von Astrozyten produziert werden. Die Expression dieser Zytokine wurde mittels RT-PCR untersucht. In Korrelation zum IFN- γ Expressionsmuster wurde CXCL-10 zu Beginn der Infektion ebenfalls gleichmäßig hochreguliert. An den darauf folgenden untersuchten Zeitpunkten (d14 und d35 nach Infektion) wurde in den Gehirnen der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere mehr CXCL-10 mRNA exprimiert als in den Kontrollen (Abb. 26A). Die Transkription der MCP-1 mRNA war während der Induktion der TE in den hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen

reduziert, diese Differenz verschwand jedoch zu späteren Zeitpunkten der Enzephalitis wieder (Abb. 26B).

IL-27, das eine durch IL-17 exprimierende CD4⁺ T-Zellen vermittelte Immunpathologie bei der TE unterbinden kann, wurde ebenfalls analysiert. Zu Beginn der Infektion, am 7. und 14. Tag, wurde IL-27 in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren und Kontrollmäusen gleichmäßig hochreguliert. Am 35. Infektionstag exprimierten hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere mehr IL-27 mRNA als an den vorangegangenen Untersuchungstagen, jedoch signifikant weniger als die Kontrollen (Abb. 26C). Interessanterweise war der Anteil IL-17 positiver CD4⁺ T-Zellen am 35. Infektionstag in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren nicht erhöht. In beiden Gruppen wurden nur wenige IL-17 exprimierende CD4⁺ T-Zellen detektiert. Jedoch war der prozentuale Anteil der CD4⁻ T-Zellen in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 26D).

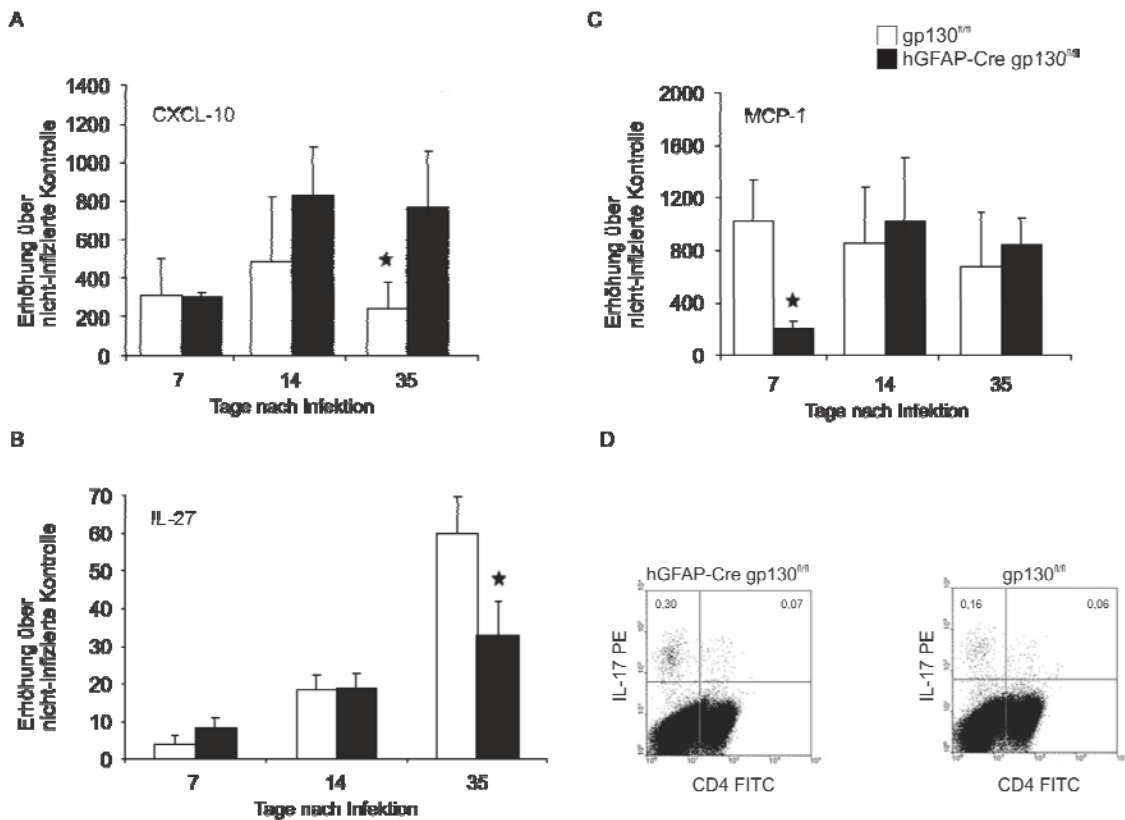
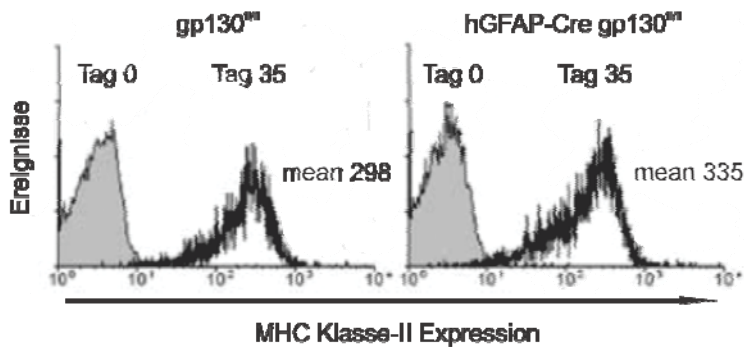


Abb. 26 Analyse der Zytokinproduktion in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} und gp130^{fl/fl} Mäusen
A mRNA Expression von CXCL-10 **B** mRNA Expression von IL-27 **C** mRNA Expression von MCP-1 **D** intrazelluläre IL-17-Färbung CD4⁺-positiver T-Zellen und durchflusszytometrische Analyse, die prozentualen Anteile IL-17-positiver CD4⁺ und CD4⁻ Zellen sind angegeben, 3 Gehirne pro Gruppe wurden zusammengeführt, eines von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt; A-C quantitative Analyse mittels RT-PCR, Angaben als Mittelwerte aus 3 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt ± SD

Ein wichtiges Enzym, welches über die Produktion von NO eine mikrobizidale Wirkung in der TE ausübt, ist iNOS. Dieses Enzym wird hauptsächlich von

Mikrogliazellen produziert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass im Gehirn der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere und der gp130^{fl/fl} Kontrollmäuse die Mikrogliazellen am 35. Infektionstag gleichermaßen aktiviert waren (Abb. 27A). In guter Übereinstimmung damit zeigte die immunhistochemische Analyse der iNOS-Expression keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 27B).

A



B

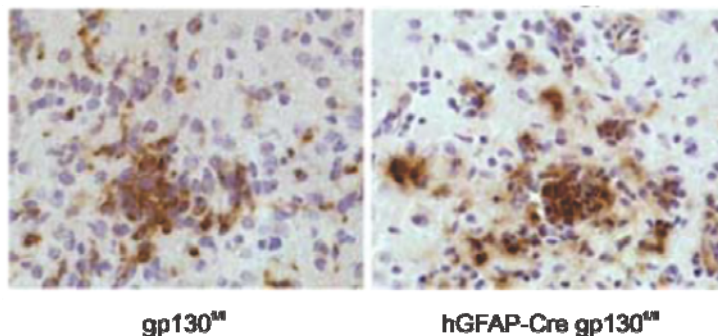


Abb. 27 normale Mikrogliaaktivierung und zerebrale iNOS-Expression in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} und gp130^{fl/fl} Mäusen

A Die MHC Klasse-II Expression der CD11c^{high}CD45^{low} Mikrogliazellen wurde durchflusszytometrisch in nicht-infizierten und infizierten Tieren am 35. Tag der Infektion ermittelt, 3 Gehirne pro Gruppe wurden zusammengeführt, **B** anti-iNOS -Immunfärbung, mit Hämalaun gegengefärbt, 100-fache Vergrößerung, repräsentative Abbildungen sind gezeigt

3.4.5 Rekrutierung von Leukozyten in das infizierte Gehirn

Um zu analysieren, ob die veränderte Expression der Chemokine MCP-1 und CXCL-10 im Verlauf der Infektion eine Veränderung der Zahl der in das Gehirn rekrutierten Leukozyten bewirkte, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten für nicht-infizierte Tiere beider Gruppen eine gleichmäßig geringe Zahl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten. Am Tag 7 der Infektion nahm die Zahl der intrazerebralen Leukozyten kaum zu, während mit Fortdauer der Infektion am 21. Tag die Zahl aller untersuchten

Leukozytenpopulationen deutlich anstieg und sich danach bis zum 35. Infektionstag in beiden Mausstämmen kaum veränderte. Es wurden an keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Rekrutierung der verschiedenen Leukozytenpopulationen gefunden (Abb. 28).

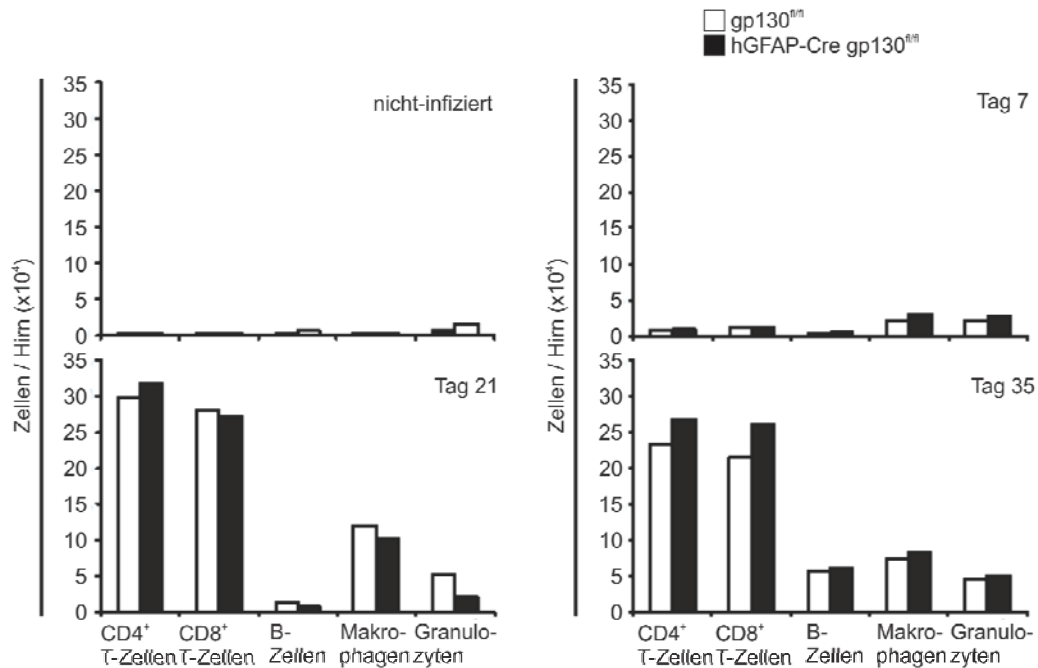


Abb. 28 Leukozytenrekrutierung

Die Zahl der intrazerebralen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten wurde durchflusszytometrisch in nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Mäusen an den Infektionstagen 7, 21 und 35 analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus 6 gepoolten Mäusen je Gruppe und Zeitpunkt.

3.4.6 Die Wirkung der *T. gondii* Infektion auf gp130-defiziente Astrozyten *in vitro*

Für *in vitro*-Experimente wurden Astrozyten aus hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen und Kontrolltieren gewonnen und mit *T. gondii* infiziert. 24 h und 48 h nach der Infektion wurde die LDH-Freisetzung aus geschädigten Zellen in das Medium als Indikator für die Zytotoxizität der Behandlung gemessen.

Sowohl 24 h als auch 48 h nach der Infektion war in den Kulturen gp130-defizienter Astrozyten der Anteil von etwa 60% toter Zellen signifikant höher als in den gp130-exprimierenden Astrozytenkulturen, in denen keine zytotoxische Wirkung detektierbar war. Eine 24-stündige Stimulation der Zellen mit TNF- α verursachte eine Zelltodrate von circa 50% in gp130-defizienten Astrozyten, während die Kontrollzellen keinen

Unterschied zu den unbehandelten Astrozyten aufwiesen. Nach 48 h stieg auch in den Kontrollen der Anteil toter Zellen an, jedoch wurde von gp130-defizienten Astrozyten weiterhin signifikant mehr LDH freigesetzt als von den Kontrollen (Abb. 29A).

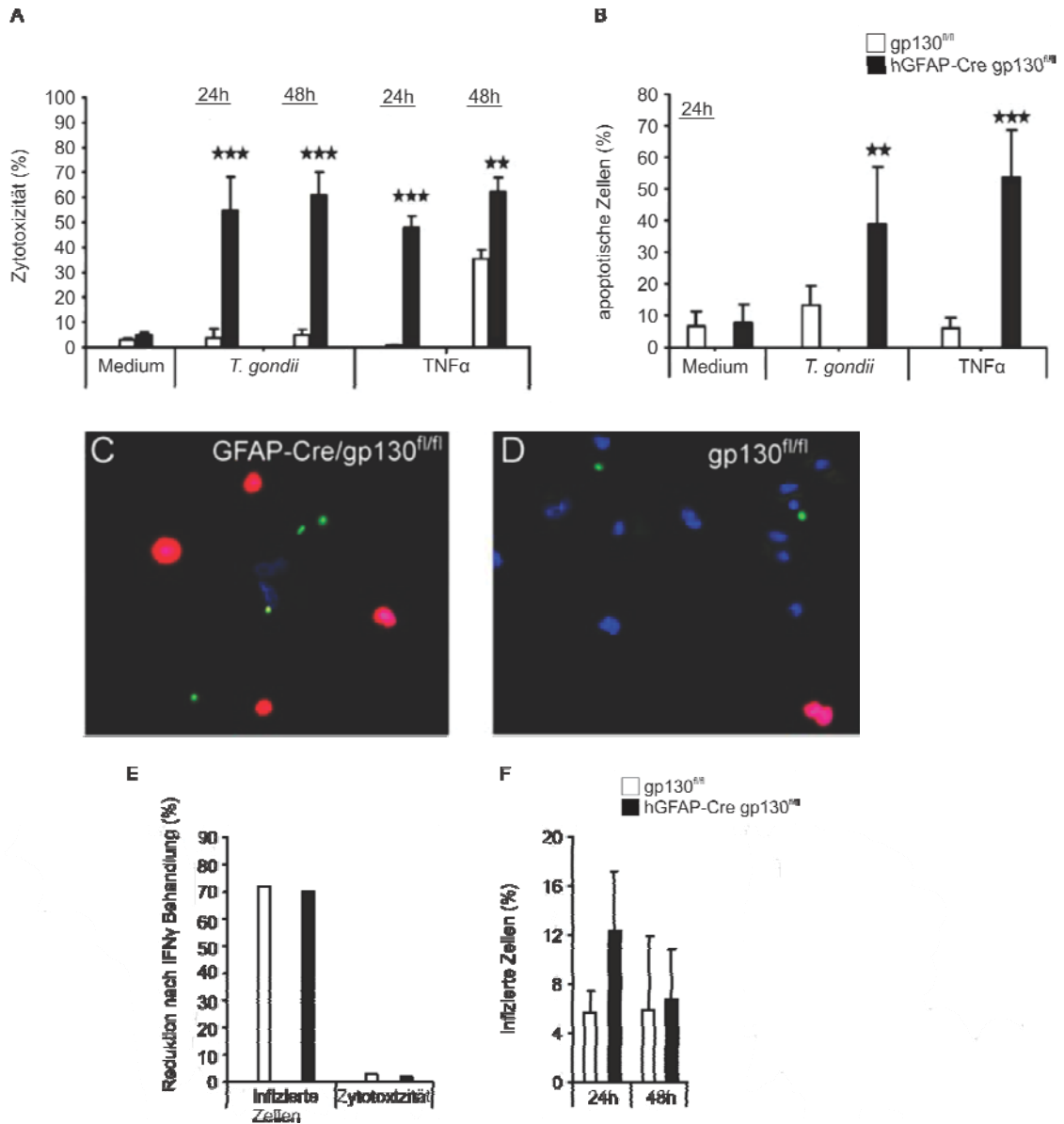


Abb. 29 Reduzierte Überlebensfähigkeit gp130-defizienter Astrozyten *in vitro*

A Kultivierte gp130⁺ und gp130⁻ Astrozyten wurden mit *T. gondii* infiziert oder mit TNF-α stimuliert. Die LDH-Freisetzung in das Zellkulturmedium wurde nach 24 h und 48 h bestimmt. **B** Die Zahl infizierter bzw. TNF-α stimulierter TUNEL⁺ kultivierter gp130⁺ und gp130⁻ Astrozyten wurde nach 24 h mikroskopisch bestimmt. **C,D** *T. gondii*-infizierte gp130⁻ (C) und gp130⁺ (D) Astrozytenkulturen wurden 24 h nach der Infektion mit anti-*T. gondii* (grün), TUNEL (rot) und DAPI (blau) gefärbt. Vergrößerung 40-fach. **E** Die Infektionsrate und LDH-Freisetzung infizierter, IFNγ-stimulierter Astrozyten wurde ermittelt. Die Reduktion der Zahl infizierter Zellen und des Zelltodes im Vergleich mit unstimulierten infizierten Kulturen ist angegeben. **F** Kultivierte, infizierte Astrozytenkulturen wurden 24 h und 48 h nach der Infektion fixiert. Die Zahl infizierter Astrozyten wurde nach Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch ermittelt. A-D Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus 3 Versuchsansätzen je Zeitpunkt und Gruppe ± SD.

Zur Bestimmung der Art des Zelltodes wurden die Kulturen 24 h nach der Behandlung fixiert und TUNEL-Färbungen angefertigt. Die anschließenden Zellzählungen der mit *T. gondii* infizierten Zellen ergaben auch hier eine signifikant erhöhte Zahl apoptotischer gp130-defizienter Astrozyten sowohl in den *T. gondii* infizierten als auch in den TNF- α stimulierten Kulturen im Vergleich zu den Kontrollkulturen (Abb. 29B). Kombinierte *T. gondii*- TUNEL- Färbungen zeigten, dass in beiden Gruppen infizierte Astrozyten vor Apoptose geschützt waren, während benachbarte, nicht-infizierte Zellen apoptotisch wurden (Abb. 29C,D). Wurden die Zellen 24 h vor der Infektion mit IFN- γ stimuliert, veränderte dies die durch *T. gondii* induzierte Zytotoxizität in beiden Gruppen nicht, obwohl die Anzahl der infizierten Zellen in beiden Gruppen um etwa 70% reduziert war (Abb. 29E). Die Zahl der infizierten Zellen unterschied sich weder nach 24 h noch nach 48 h signifikant zwischen den Gruppen (Abb. 29F).

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass astrozytär exprimiertes gp130 ein wichtiger Überlebensfaktor bei der TE ist. Aktivierte Astrozyten begrenzen *in vivo* die Entzündungsherde und tragen so zur Kontrolle der intrazerebralen *T. gondii*-Infektion bei. Mäuse mit einer Deletion der Rezeptoruntereinheit gp130 auf Astrozyten zeigten keine Astrogliose und litten an einer schweren TE mit einer höheren Parasitenzahl, einer unzureichend kontrollierten Entzündungsreaktion und einem Astrozytenverlust in den entzündeten Bereichen. IFN- γ , das wichtigste protektive Zytokin in der TE, und IGTP, welches toxoplasmazidal wirkt, waren in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen sogar erhöht, konnten jedoch die Parasitenlast nicht auf das Kontrollniveau reduzieren. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass diese antiparasitären Mechanismen in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen nicht beeinflusst waren, sondern dass der Verlust der Astrozyten zu einer unkontrollierten Ausbreitung der Infektion führte. *In vitro*-Experimente belegten, dass Astrozyten, welche kein gp130 exprimierten, infolge von Zytokinstimulation oder *T. gondii*-Infektion apoptotisch wurden, während gp130 in Kontroll-Astrozyten zum Überleben der Zellen beitrug.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig die essentielle protektive Funktion von Astrozyten und Neuronen im murinen Modell der TE. Eine selektive Deletion der gp130-Expression auf der Zelloberfläche von Astrozyten oder Neuronen mit Hilfe des Cre-lox-Systems resultierte in einer Apoptose dieser Zellen, einer insuffizienten Parasitenkontrolle, einer dysregulierten Zytokinproduktion und einem letalen Verlauf der TE. Der Neuronen- bzw. Astrozytenverlust führte dazu, dass die Zellen ihre wichtige protektive Funktion bei der TE nicht mehr ausüben konnten. Bei Neuronen war dies vor allem die Produktion der immunsuppressiven Moleküle TGF- β und IL-27 und bei Astrozyten ihre Fähigkeit, die Ausbreitung der Toxoplasmen und der Entzündungsreaktion durch eine Astrogliose einzudämmen.

Der gp130-Rezeptor spielt nicht nur in der Immunantwort, sondern bereits während der Embryogenese eine entscheidende Rolle. Eine konventionelle Deletion von gp130 in allen Zellen verläuft embryonal oder perinatal letal, so dass solche Versuchstiere für Infektionsexperimente nicht zur Verfügung stehen. Diese Tiere zeigen bereits embryonal eine gestörte Astrozyten- und Neuronenentwicklung, ein hypoplastisches Myocard, eine veränderte Hämatopoese und Defekte im Knochenbau (Betz et al., 1998; Nakashima et al., 1999; Shin et al., 2004; Yoshida et al., 1996b). Im Zuge dieser Arbeit wurde auch versucht, Mäuse zu generieren, in denen gp130 in Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten deletiert ist. Diese Nestin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse sind jedoch ebenfalls nicht lebensfähig: unter 50 getesteten Nachkommen aus unterschiedlichen Verpaarungen (weibliche oder männliche Nestin-Cre transgene gp130^{WT/fl} Tiere wurden mit gp130^{fl/fl} Tieren verpaart) wurden keine Nestin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse geboren. Nestin-Cre wird ab E11 (JAX MICE database) exprimiert, so dass ab diesem Zeitpunkt gp130 deletiert wird. Das Fehlen des gp130-Signals zu diesem frühen Zeitpunkt in den betroffenen Zelltypen ist jedoch entscheidend für das Überleben der Tiere. Bekannt ist, dass Zytokine der IL-6 Familie, wie CNTF, CT-1, CLC und LIF, eine Differenzierung der Vorläuferzellen zu Gliazellen bewirken (Bonni et al., 1997; Cameron et al., 1998; Nakashima et al., 1999; Ochiai et al., 2001; Uemura et al., 2002b) und dass Neuronen, welche sich zeitlich vor den Astrozyten entwickeln und vernetzen (murine Neuronen E12 bis E18, murine Astrozyten ab E18), CT-1 ausschütten. Hierdurch wird über den gp130-Rezeptor der JAK-STAT-Signalweg aktiviert und die Gliogenese initiiert (Barnabe-Heider et al., 2005). Ebenso besteht auch die Möglichkeit, dass das Fehlen der gp130-vermittelten Signale in allen betroffenen Zelltypen, unabhängig vom Zeitpunkt der Deletion, wichtig für die Entwicklung der hirnsässigen Zellen und somit für das Überleben der Tiere ist.

Der Synapsin-Promotor, der zur Deletion von gp130 in Neuronen verwendet wurde, ist ab dem Embryonaltag 12,5 (E12,5) aktiv (JAX MICE database). Bei Verwendung des hGFAP-Promotors zur astrozytären Deletion wird die mit diesem Promotor fusionierte Cre-Rekombinase erst am E14,5 aktiv, so dass bis zu diesen beiden Zeitpunkten die Entwicklung des Gehirns in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl}, bzw. Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren bei intakter gp130-Expression verläuft (Bajenaru et al., 2002; Zhu et al., 2001). Histologische Analysen zeigten in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} und hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren eine normale Architektur des Gehirns. Beide Gruppen wiesen unter physiologischen Bedingungen keine Änderungen hinsichtlich des Verhaltens oder der Reproduktion auf und waren daher sehr gut zur Analyse der TE geeignet. Hinzu kommt, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass bei der TE im Gehirn von Wildtyp-Mäusen alle IL-6 Zytokine hochreguliert werden und gp130 somit einen Einfluss auf die TE haben sollte.

In vitro verursachte die Infektion mit *T. gondii* eine vermehrte Apoptose gp130-defizienter Astrozyten und Neuronen, während in den Kontrollkulturen kaum apoptotische Zellen gefunden wurden. Auch die Stimulation mit TNF- α trieb gp130-defiziente Astrozyten in die Apoptose. Gp130-exprimierende Neuronen konnten hingegen der proapoptotischen Wirkung des Zytokins entgegenwirken. Auf eine *T. gondii* Infektion reagierten sowohl gp130-defiziente Astrozyten als auch gp130-defiziente Neuronen mit Apoptose. Interessanterweise starben sowohl in gp130-defizienten als auch in gp130-exprimierenden Zellkulturen vorzugsweise die nicht infizierten Zellen, während die infizierten Zellen überlebten. Diese Ergebnisse fügen sich gut in frühere Beobachtungen ein, bei denen am Beispiel verschiedenster Apoptose-induzierender Substanzen die anti-apoptotische Wirkung von *T. gondii* und anderen Parasiten, wie *Leishmania spp.*, *Plasmodium berghei* oder *Trypanosoma cruzii* auf ihre Wirtszellen beschrieben wurde (Goebel et al., 2001; Hashimoto et al., 2005; Hippe et al., 2009; Leiriao et al., 2005; Moore et al., 1994; Nash et al., 1998; Yamada et al., 2011). Für Toxoplasmen als obligat intrazellulären Parasiten ist die Inhibition der Apoptose der Wirtszelle wichtig, um das eigene Überleben zu sichern. Schlüter et al. (2001) konnten zeigen, dass infizierte Neuronen *in vitro* IL-1, IL-6, MIP-1 α und MIP-1 β sezernieren. *T. gondii* infizierte Astrozyten sezernieren GM-CSF und ebenfalls IL-1 und IL-6 (Fischer et al., 1997). Der Tod der uninfizierten Zellen wird daher vermutlich nicht durch den Parasiten selbst, sondern indirekt durch die Sekretion von Immunmediatoren verursacht. Ob die Expression eines dieser Zytokine zur Apoptose nicht infizierter Zellen in *T. gondii* infizierten Astrozyten- bzw. Neuronenkulturen führte und welche Signalwege involviert waren, ist bisher unbekannt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimente verdeutlichen jedoch die immense Wichtigkeit der Rezeptoruntereinheit gp130 in der *T. gondii* Infektion als Überlebensfaktor von Astrozyten und Neuronen in der Antwort auf eine

inflammatorische Umgebung. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass alle Zytokine der IL-6 Familie *in vitro* einen gleich starken anti-apoptotischen Effekt auf die Neuronen ausübten. Aus diesen Ergebnissen kann man annehmen, dass auch *in vitro* das Fehlen eines Zytokins der IL-6 Familie durch die Wirkung eines anderen Zytokins dieser Gruppe ausgeglichen werden kann.

Offensichtlich vermittelt gp130 auch *in vivo* eine essentielle anti-apoptotische Wirkung bei verschiedensten Erkrankungen. Hinweise darauf wurden bereits in früheren Arbeiten gefunden. So zeigen LIF^{-/-} Mäuse einen milderen Verlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem murinen Modell der multiplen Sklerose, verbunden mit einer geringeren Makrophageninfiltration, einer verminderten IFN- γ Produktion und einer reduzierten Demyelinisation, verglichen mit den Kontrollen (Linker et al., 2008). Die Inhibition von IL-6 im Serum von Osteomyelitis-Patienten führte zu einer deutlichen Zunahme der Apoptose neutrophiler Granulozyten (Asensi et al., 2004) und eine IL-6-Behandlung von Mäusen im hämorrhagischen Schock reduzierte die Zahl apoptotischer Leberzellen auf das Kontrollniveau (Arikan et al., 2006). Weiterhin beschrieben Liu et al. (2010) eine STAT3-Abhängigkeit der anti-apoptotischen Wirkung von IL-6 in Leberkarzinomzellen nach Zytostatikabehandlung. Weitere Hinweise auf einen anti-apoptotischen Effekt des gp130-vermittelten Signalweges lieferten Experimente, in denen diese Wirkung nach biomechanischem Stress in Kardiomyozyten, nach mechanischem Trauma in Oligodendrozyten oder auch nach LPS-Stimulation in Hepatozyten nachgewiesen wurde (Kerr and Patterson, 2005; Streetz et al., 2003; Yasukawa et al., 2001). Der Einfluss der IL-6 Expression bei der TE wurde in früheren Arbeiten mit Hilfe IL-6 defizienter Mäuse untersucht. In diesen Mäusen wurden eine reduzierte intrazerebrale Erregerkontrolle, eine exzessive intrazerebrale bzw. okuläre nekrotisierende Entzündungsreaktion, sowie eine erhöhte Mortalität beschrieben (Jebbari et al., 1998; Lyons et al., 2001; Silver et al., 2011). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden in diesen Publikationen jedoch nicht die einzelnen hirnsässigen Zellpopulationen detailliert untersucht, so dass keine Daten zum Verlust von Astrozyten oder Neuronen in *T. gondii*-infizierten IL-6^{-/-} Tieren erhoben wurden. Hinzu kommt, dass konventionelle Mausmutanten verwendet wurden, so dass durch die Deletion von IL-6 in allen Körperzellen ein deutlich größerer *in vivo*-Effekt als bei einem konditionalen Knockout auftrat. Weitere Arbeiten untersuchten, welcher der über gp130 aktivierten Signalwege wichtig bei der TE ist. Hierzu wurde die Bindungsstelle für den Suppressor der STAT-Signale 3 (SOCS3) mutiert (gp130Y757F) oder SOCS3 bzw. SOCS1 deletiert, so dass die STAT-Signale nicht beendet werden konnten (Silver et al., 2011; Whitmarsh et al., 2011). Wird SOCS1 deletiert, verlängert sich die durch IFN- γ ausgelöste STAT-1 Aktivität, während IL-6 keinen Einfluss auf STAT-1 hat (Croker et al., 2003; Croker et al., 2008; Lang et al., 2003). Im Gegensatz dazu ist in Tieren mit einer SOCS3-Deletion die Aktivierung von STAT-1 und STAT-3

nach Stimulation mit IL-6 verlängert, eine Stimulation mit IFN- γ oder IL-10 hat hingegen keinen Effekt auf die Dauer der STAT1 und STAT3 Aktivität. So bewirken SOCS1 und SOCS3 durch ihren Einfluss auf die STAT1 und STAT3 Aktivität eine unterschiedliche Wirkung von IL-6 und IFN- γ vermittelten Signalen auf die Genexpression. Eine Infektion von SOCS3-defizienten Tieren mit *T. gondii* führte zu einer erhöhten Parasitenzahl und einer dysregulierten Zytokinproduktion mit initial verringerter IL-12 und IFN- γ Produktion. Auch andere antimikrobiell wirksame Effektormoleküle wie die p47 GTPasen wurden im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weniger stark gebildet und IL-10, ein Antagonist der IL-12-Produktion wurde verstärkt exprimiert. Aufgrund dieser veränderten Regulation erhöhte sich die Letalität der untersuchten Knockout-Mäuse signifikant (Silver et al., 2011; Whitmarsh et al., 2011). Aber auch der Parasit kann in den STAT-Signalweg eingreifen. Studien belegen, dass ROP16, ein von *T. gondii* sezerniertes Protein mit Kinaseaktivität, sowohl STAT3 als auch STAT6 aktiviert. In Makrophagen wird auf diese Weise die Produktion proinflammatorischer Zytokine gehemmt (Butcher et al., 2011; Ong et al., 2010). Ebenso wirkt auch ROP18, welches die p47 GTPase IRG deaktiviert und damit die IFN- γ vermittelte Zerstörung der PVM verhindert (Fentress et al., 2010).

Sowohl in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren, als auch in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen war ein starker Verlust der gp130-defizienten Astrozyten bzw. Neuronen detektierbar. In hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren gingen die gp130 defizienten Astrozyten vor allem innerhalb der entzündeten Bereiche verloren. Dieser Verlust führte dazu, dass die Entzündungsherde nur unzureichend begrenzt und die Vermehrung, sowie die Ausbreitung der Parasiten im Gehirn nicht effektiv aufgehalten werden konnten. Auf diese Weise beeinflusste die erhöhte Apoptose der gp130-defizienten Astrozyten den Verlauf der TE stark. Auch in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren gingen die gp130-defizienten Zellen zugrunde. Es wurden Regionen mit einer dramatisch reduzierten Neuronenzahl innerhalb der entzündeten Bereiche detektiert. Jedoch waren mit Fortdauer der Infektion, anders als bei den gp130-defizienten Astrozyten, auch Areale von Neuronenverlust betroffen, die frei von entzündlichen Infiltraten waren. Dies könnten Gebiete sein, in denen der Neuronenverlust nach einer abgelaufenen Entzündungsreaktion persistierte. Da Neuronen nur eine sehr begrenzte regenerative Kapazität besitzen und dieser Zelltyp bis auf wenige Ausnahmen nicht zur Neogenese im adulten Gehirn befähigt ist, blieben diese Gebiete nach beendeter Entzündungsreaktion als neuronienarme Areale detektierbar. Die Bereiche mit besonders starkem Neuronenverlust befanden sich vor allem im Kortex der untersuchten Tiere. Dies könnte daraus resultieren, dass *T. gondii* vor allem kortikale, und beispielsweise nur in geringem Maße zerebelläre, Neuronen infiziert (Berenreiterova et al., 2011; Fentress et al., 2010), die kortikalen Neuronen Synapsin-I exprimieren und somit gp130-defizient sind. Diese Einschätzung korreliert gut mit den *in vitro*-Ergebnissen, die

ebenfalls eine erhöhte Apoptose infizierter gp130-defizienter Zellen zeigen. So ist es möglich, dass sowohl die gp130-defizienten Neuronen, als auch die gp130-defizienten Astrozyten, beeinflusst von den bei der TE freigesetzten Zytokinen, zugrunde gegangen sind. In Hirnschnitten infizierter hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} oder Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tiere konnten nur selten geschrumpfte Astrozyten mit einem kondensierten Zellkern detektiert werden, die einen Hinweis auf ein apoptotisches Geschehen liefern konnten. Auch TUNEL-Färbungen zeigten nur selten apoptotische Zellen. Dies resultiert vermutlich aus der Tatsache, dass die Zellen über einen langen Zeitraum hinweg nach und nach abstarben, jedoch nur kurze Zeit TUNEL⁺ waren und apoptotischen Zellen schnell von Makrophagen eliminiert wurden. Es ist jedoch auch ohne den direkten *in vivo*-Nachweis der Apoptose zu vermuten, dass, analog zur *in vitro*-Situation, diese Zellen aufgrund der Infektion und der Einwirkung proinflammatorischer Zytokine zugrunde gingen. Obwohl die Infektion auch in Kontrollmäusen mit einem leichten Neuronenverlust einherging, war dieser nicht progressiv, wie in den Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen. Dieser milde Neuronenverlust in den Kontrolltieren könnte jedoch weniger auf den Infektionsverlauf, sondern vielmehr auf das Verhalten der infizierten Tiere Einfluss haben. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen ein verändertes, weniger ängstliches Verhalten von *T. gondii* infizierten Individuen (Berdoy et al., 2000; Berenreiterova et al., 2011; Fentress et al., 2010; Flegr, 2007; Haroon et al., 2012; Lamberton et al., 2008).

Weder hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} noch Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse waren in der Lage, die Replikation und Verbreitung der Toxoplasmen effizient einzudämmen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle der intrazerebralen Parasiten auch vom gp130-Signalweg abhängig ist. So weisen oral infizierte IL-6 defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine signifikant höhere intrazerebrale Parasitenzahl auf (Jebbari et al., 1998; Suzuki et al., 1997) und entwickeln eine okuläre Toxoplasmose (Lyons et al., 2001). Die Mechanismen, die zu einer erhöhten Parasitenlast in IL-6 defizienten Mäusen führen, werden von Suzuki et al. (1996) und Jebbari et al. (1998) kontrovers diskutiert. Während Suzuki eine verringerte intrazerebrale IFN- γ -Produktion und reduzierte Leukozytenzahlen feststellte, beobachteten Jebbari eine erhöhte IFN- γ -Synthese und eine mit den Kontrolltieren vergleichbare intrazerebrale Infiltration mit inflammatorischen Zellen. Hinzu kommt, dass Lyons et al. (2000) in der okulären Toxoplasmose einen TNF- α Anstieg detektierten. In hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren konnte analog zu Jebbari et al. (1998) ein Anstieg der IFN- γ -Produktion und eine normale Infiltration mit Leukozyten beobachtet werden. In diesen Tieren war die Verbreitung der Toxoplasmen im Gehirn vor allem durch das Fehlen der Astrozytenaktivierung erleichtert. Die Astrozyten umschließen im Normalfall Entzündungsherde und schirmen so das umliegende Gewebe von eingedrungenen Krankheitserregern ab. Dieser Vorgang ist abhängig von der GFAP-Expression der

Astrozyten. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass GFAP⁻ Astrozyten induzierte zerebrale *Staphylokokkus aureus* Abszesse weniger gut umschließen als GFAP⁺ Astrozyten, was zu größeren Abszessen und einer schwereren Erkrankung der Versuchstiere führte. Auch bei der TE sind GFAP⁻ Astrozyten nicht in der Lage, die Entzündungsherde abzugrenzen und die Vermehrung und Verteilung der Parasiten zu verhindern. Jedoch hatte dies keinen Einfluss auf das Überleben der Tiere, da die Astrozyten nicht abstarben und die inflammatorischen Läsionen besser begrenzen konnten als in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen (Stenzel et al., 2004). Der Verlust des astrozytären membranständigen gp130 geht in der Nähe der Entzündungsherde mit einem Verlust der Aktivierungsfähigkeit der Astrozyten einher. GFAP wurde nicht hochreguliert und die Zahl der Astrozyten nahm nicht zu. Ähnliche Befunde machten auch Holmberg und Patterson, die in Pilocarpin-behandelten LIF^{-/-} Mäusen eine geringere Astrozytenaktivierung fanden als in den Kontrollen (Holmberg and Patterson, 2006). Aufgrund der fehlenden Astrogliose waren die Nekrosen in den hier untersuchten *T. gondii* infizierten hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen deutlich ausgeprägter als in den Kontrollen. Interessanterweise fand in den entzündungsentfernteren Bereichen eine gleich starke Astrozytenaktivierung in beiden Gruppen statt.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass oral infizierte Mäuse mit einer konventionellen IL-6 Deletion im Vergleich zu Wildtyp-Tieren sehr früh, beginnend am Tag 14 nach Infektion, sterben (Jebbari et al., 1998; Suzuki et al., 1997). Im Gegensatz dazu überlebten sowohl hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} als auch Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tiere mit 50 Infektionstagen deutlich länger. Hier war vermutlich von besonderer Bedeutung, dass aufgrund des massiven Astrozytenverlustes die Parasiten nicht effektiv kontrolliert werden konnten und so eine Vielzahl von Entzündungsherden mit intrazerebralen Nekrosen auftrat. Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tiere überlebten bis zum 80. Infektionstag, zeigten jedoch einen ausgeprägten Verlust von Neuronen innerhalb und außerhalb der zum Zeitpunkt der Untersuchung aktiven inflammatorischen Regionen. Diese *in vitro* und *in vivo* Versuche zeigen, dass das Überleben einer TE entscheidend von der Funktion gp130-induzierter Astrozyten- und Neuronen-Reaktionen abhängig ist. Jedoch scheinen die Wirkungsweisen, die zur erhöhten Mortalität der konditionalen Knockout-Mäuse führen, in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen und Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen unterschiedlich zu sein. Bei der TE ist das permanente Vorhandensein intrazerebraler IFN- γ produzierender T-Zellen für die Kontrolle der persistierenden Parasiten notwendig. IFN- γ induziert IGTP, welches STAT-1 abhängig das Wachstum der Parasiten hemmt (Collazo et al., 2002; Melzer et al., 2008). In hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen war die Parasitenlast signifikant erhöht. Als Reaktion darauf wurden sowohl IFN- γ als auch astrozytäres IGTP signifikant über das Kontrollniveau hochreguliert, ohne jedoch die Parasitenreplikation und -verbreitung effektiv eindämmen zu können. Tatsächlich gibt es aus anderen Arbeiten Hinweise darauf, dass eine stark erhöhte IFN- γ

Sekretion nicht zwangsläufig zu einer effektiveren Parasitenkontrolle führt, sondern eine Überproduktion von IFN- γ gewebsschädigend wirkt (Gresser et al., 1981; Toyonaga et al., 1994; Trinchieri, 2010; Gavrilescu and Denkers, 2001). Wichtige Mediatoren der Immunantwort bei der TE sind auch Mikrogliazellen. Diese hirnansässige Makrophagenpopulation wurde in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen ebenso wie in den Kontrolltieren aktiviert. Auch die Produktion von iNOS, einem Enzym, das eine toxoplasma-statische Aktivität vermittelt und dadurch ein längeres Überleben der Tiere bewirkt (Chao et al., 1993; Deckert et al., 2006), wurde in beiden Gruppen gleichermaßen exprimiert. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die gestörte Kontrolle der Parasitenreplikation nicht auf eine unzureichende Produktion toxoplasmazidaler Substanzen wie IFN- γ , IGTP und iNOS in Astrozyten und Mikroglia zurückzuführen ist. Gestützt wird dies durch die *in vitro*-Experimente, in denen die Stimulation der gp130-defizienten Astrozyten und der gp130-exprimierenden Astrozyten mit IFN- γ zu einer gleich starken Reduktion der Apoptose, jedoch nicht zu einer verminderten Parasitenzahl und -replikation in beiden Gruppen führte.

Eine weitere wichtige Funktion der Astrozyten liegt in der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke. Diese dient zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns und bildet eine hochselektive Barriere zum Schutz des Gehirns vor Pathogenen und Toxinen. Bei Infektionen müssen jedoch Leukozyten zur Abwehr der intrazerebralen Pathogene in das Hirnparenchym rekrutiert werden (Feustel et al., 2012; Lachenmaier et al., 2011; Masocha and Kristensson, 2012). Dies geschieht durch die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Sekretion von Chemokinen. Bei der TE der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse wurden die Chemokine CXCL-10 und MCP-1 in gleicher Stärke wie in den Kontrollmäusen exprimiert. In guter Übereinstimmung mit der Chemokinexpression wurden identische Mengen an Leukozyten in das Gehirn beider Gruppen rekrutiert. Die Zusammensetzung der intrazerebralen Leukozytenpopulationen der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse und der gp130^{fl/fl} Kontrolltiere unterschied sich ebenfalls nicht voneinander. In beiden Gruppen wurden nahe der *T. gondii*-Zysten oder -Tachyzoiten inflammatorische Leukozyten detektiert. Dies zeigt, dass der partielle perivaskuläre Verlust der Astrozyten keinen Einfluss auf die Rekrutierung der Leukozyten hatte und dass der intrazerebrale Verlust von Astrozyten die Migration der Leukozyten zu den parasitären Entzündungsherden nicht veränderte. Trotzdem konnten die eingewanderten Leukozyten den Astrozytenverlust und die ineffiziente Abgrenzung der entzündeten Bereiche nicht kompensieren. Dies führte letztendlich zur Ausbreitung der Entzündung und zum Tod der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gefundenen erhöhten IFN- γ Produktion in Mäusen mit astrozytärer gp130-Defizienz wurden in den bei Silver et al. (2011) verwendeten gp130^{Y757F} Tieren und den von Suzuki et al. (1997) getesteten IL-6-defizienten Tieren eine geringere IFN- γ Synthese bei ebenfalls gleich hoher Leukozytenrekrutierung beobachtet. IL-27-Rezeptor

defiziente Mäuse hingegen entwickeln bei der TE eine T-Zell Antwort, die mit einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine einhergeht. Es wird verstärkt IFN- γ sezerniert und die T-Zell Proliferation und Produktion von IL-17 sind stark erhöht. Allerdings kann diese Immunantwort nicht beendet werden, da IL-27, ein Zytokin das die durch IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen vermittelte Immunpathologie eindämmen kann, fehlt. Die Tiere sterben im Folgenden an einer überschießenden T-Zell vermittelten Entzündungsreaktion bei normaler Parasitenlast (Stumhofer et al., 2006; Villarino et al., 2003). IL-17 ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ein proinflammatorisches Zytokin mit pleiotropen Aktivitäten. Zum einen induziert IL-17 Zytokine wie IL-6 und TNF, Chemokine wie MCP-1 und MIP-2, und Metalloproteasen, die für die Gewebeeinfiltration und -zerstörung verantwortlich sind (Kolls and Linden, 2004). Zum anderen ist IL-17 auch verantwortlich für die Proliferation, Reifung und Chemotaxis von Neutrophilen Granulozyten und die Maturation von dendritischen Zellen (Fossiez et al., 1996; Kolls and Linden, 2004). In diesem Zusammenhang wurde auch in dieser Arbeit die zerebrale IL-27-Expression infizierter Tiere analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere weniger IL-27 mRNA exprimierten als die entsprechenden Kontrollen am 35. Infektionstag. In der daraufhin durchgeführten Analyse des Vorkommens IL-17-produzierender CD4⁺ T-Zellen konnte jedoch trotz der niedrigeren IL-27 Expression in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen, keine Erhöhung der Zahl IL-17 produzierender T-Zellen festgestellt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass keine IL-17 vermittelte Immunpathologie in den Gehirnen der hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere auftrat.

hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse wiesen eine Deletion von gp130 in einem geringen Teil der Neuronen auf. Es konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob diese gp130-defizienten Neuronen während der Infektion zugrunde gingen. Möglicherweise ergab sich ein synergistischer Effekt aus dem Verlust der gp130-Expression auf den Astrozyten zusammen mit dem gp130-Verlust auf einem geringen Anteil der Neuronen, der sich auf das Überleben der Tiere auswirkte. Jedoch überlebten die Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse mit 80 Infektionstagen deutlich länger als die hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tiere, die bis zum 50. Tag nach der Infektion verstarben. Es kann daher vermutet werden, dass der Einfluss des partiellen Neuronenverlustes in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren auf den Verlauf der TE eine untergeordnete Rolle spielte.

Während Astrozyten den Verlauf der TE stark durch die Eingrenzung der entzündeten Bereiche beeinflussen, haben Neuronen nicht die Funktion und Fähigkeit der Begrenzung von Entzündungsherden. Da jedoch Neuronen diejenigen Zellen sind, die *in vivo* besonders stark von *T. gondii* infiziert werden (Ferguson and Hutchison, 1987; Haroon et al., 2012; Melzer et al., 2008), wurde vermutet, dass diese

Zellpopulation die Erkrankung immunologisch beeinflusst. Jedoch ist bislang noch wenig über den Einfluss der Neuronen auf den Verlauf der TE bekannt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass IFN- γ und TNF- α *in vitro* allein nicht in der Lage sind, eine toxoplasmastatische Aktivität in Neuronen zu induzieren (Schluter et al., 2001). Die in dieser Arbeit für *in vitro* Experimente verwendeten gp130-defizienten Neuronen waren, wie auch die Kontrollneuronen, ebenfalls nach IFN- γ oder TNF- α Stimulation nicht in der Lage, die Invasion oder Replikation der Parasiten zu beeinflussen. Zusätzlich konnte auch nach Stimulation mit den Zytokinen der IL-6 Familie in beiden Gruppen keine Wirkung auf die Parasitenvermehrung oder die Zahl infizierter Zellen festgestellt werden. Offensichtlich wird die Parasitenkontrolle in Neuronen durch andere bisher nicht ausreichend charakterisierte Mechanismen induziert, die eine Invasion verhindern und/oder toxoplasmastatisch wirken. Möglich ist, dass von Astrozyten produzierte Faktoren schützend auf die Neuronen wirken. Eine potentiell wirksame Substanz ist die von Astrozyten sezernierte Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO). Untersuchungen haben gezeigt, dass astrozytär sezernierte IDO in der Lage ist, durch die Degradation von L-Tryptophan zu Kynurenin die Vermehrung der Tryptophan-auxotrophen Toxoplasmen zu verhindern (Fujigaki et al., 2002; Oberdorfer et al., 2003). Jedoch kann das entstandene Kynurenin weiter zu Chinolinsäure metabolisiert werden, die über NMDA-Rezeptoren neurotoxisch wirkt und ebenfalls für das Absterben der Neuronen mit verantwortlich sein könnte (Stone, 2001). Experimente kokultivierter Astrozyten und Neuronen in verschiedenen Kompartimenten könnten hier Aufschluss über sezernierte neuroprotektive astrozytäre Substanzen geben.

Mäuse mit einem neuronalen Defizit der gp130-Expression zeigten eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der Infektion mit *T. gondii*. Die Menge intrazerebraler Parasiten war in den Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen signifikant erhöht. Ein Grund dafür könnte sein, dass dendritische Zellen, die in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen verstärkt in das Gehirn rekrutiert werden, von den Parasiten als „Trojanische Pferde“ benutzt werden, um im Inneren dieser Zellen vom Immunsystem unbemerkt in das Gehirn zu gelangen (Courret et al., 2006). Diese erhöhte Parasitenzahl kann also gp130-unabhängig entstanden sein, da in *in vitro*-Experimenten belegt werden konnte, dass alle Zytokine der IL-6 Familie keinen Einfluss auf die Invasion und Replikation der Toxoplasmen hatten. Es ist jedoch auch möglich, dass für die Erregerkontrolle nicht ein einziges Zytokin, sondern eine Kombination verschiedener Zytokine der IL-6 Familie wichtig ist. Es konnte jedoch auch eine intrazerebral gestörte Erregerkontrolle gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren wurden freie Tachyzoiten im Hirnparenchym gefunden, die dort Nekrosen verursachten. Eine effiziente Parasitenkontrolle und das Überleben der TE erfordert zum einen die Produktion schützender Zytokine wie IFN- γ und zum anderen immunsuppressiver Zytokine wie IL-

27 und TGF- β , welche die Inflammation limitieren und eine tödlich verlaufende Immunpathologie verhindern. Die erhöhte Parasitenlast bewirkte eine intrazerebrale Hyperinflammation der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse mit signifikant erhöhten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellzahlen. Gleichzeitig war das intrazerebrale IL-27 Niveau in diesen Mäusen signifikant geringer als in den Kontrollen. In guter Übereinstimmung mit dem reduzierten IL-27-Spiegel war die Zahl IL-17 produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, wie bei Stumhofer et al. (2006) auch für IL-27R^{-/-} Mäuse beschrieben, signifikant erhöht. Hierin unterschieden sich hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} und Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäuse. Die erhöhte Expression von IL-27 führte nur in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen, jedoch nicht in hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Tieren zu einer Zunahme IL-17 produzierender T-Zellen. Es scheint hier einen Zusammenhang zwischen der IL-27 exprimierenden Zellpopulation und der Bildung IL-17 produzierender T-Zellen zu geben. Die Ergebnisse der Stimulation gp130 exprimierender Neuronen *in vitro* geben Hinweise darauf, dass nicht der Parasit selbst, sondern ein gp130-abhängiger Signalweg die IL-27-Synthese stimuliert. Während infizierte Neuronen kein IL-27 sezernierten, bewirkte die Stimulation der Zellen mit IL-6 eine Ausschüttung von IL-27 in das Medium. Im Gegensatz dazu reagierten gp130 defiziente Neuronen weder auf die IL-6-Stimulation noch auf die Infektion mit der Sekretion von IL-27. Diese bisher erstmals beschriebene Beobachtung, dass Neuronen IL-6-abhängig IL-27 produzieren, ist von besonderer Bedeutung, da auf diese Weise auch die Neuronen immunmodulatorisch auf die Infektion einwirken können. In einem weiteren Experiment wurde die Abhängigkeit der TGF- β Produktion von der IL-6 Stimulation demonstriert. Die Stimulation mit IL-6 induzierte *in vitro* eine erhöhte neuronale Produktion von aktivem und inaktivem TGF- β in gp130 exprimierenden Neuronen. Die Infektion mit *T. gondii* verstärkte nur die Synthese von inaktivem, jedoch nicht von aktivem TGF- β in diesen Zellen. Gp130-defiziente Neuronen reagierten erwartungsgemäß nicht auf die IL-6 Stimulation. Es erfolgte auch keine Regulation der TGF- β -Expression nach Infektion der Zellen, was die Vermutung stützt, dass auch hier ein gp130-abhängiger Mechanismus vorliegt. Die reduzierte Synthese von TGF- β , die auch *in vivo* detektiert wurde, könnte eine überschießende Immunantwort fördern, da dieses Zytokin die IFN- γ -Produktion der T-Zellen reguliert (Schluter et al., 1998). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen sind in den Gehirnen der Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tiere mehr IFN- γ produzierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen detektiert worden. TGF- β scheint demnach einen ähnlichen Effekt im Gehirn zu haben, wie er auch für die *T. gondii*-assoziierte Darmpathologie beschrieben wurde. Hier vermittelt TGF- β ebenfalls eine anti-inflammatorische und IFN- γ -regulierende Wirkung nach oraler Infektion (Buzoni-Gatel et al., 2001).

T. gondii-infizierte Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöhte Zahlen intrazerebraler inflammatorischer Leukozyten auf. Bei *T. gondii*-infizierten Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tieren waren sowohl die absolute,

als auch die relative Zahl intrazerebraler IFN- γ -produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erhöht. Obwohl IFN- γ von essentieller Bedeutung für das Überleben der TE ist, führt eine Überproduktion dieses Zytokins zur Schädigung der Zellen. Israelski et al. publizierten bereits 1989 die interessante Beobachtung, dass eine Depletion der CD4⁺ T-Zellen in der chronischen Phase der TE die Entzündung reduzieren konnte. Nach der Beendigung der Behandlung der Mäuse mit anti-CD4 Antikörpern erreichten erneut funktionelle CD4⁺ T-Zellen das Gehirn und die Entzündungsreaktion verstärkte sich wieder (Israelski et al., 1989). Auch in der Immunpathologie des Darmes spielen IFN- γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen eine wichtige proinflammatorische Rolle nach einer hochdosierten oralen Infektion mit Toxoplasmen (Liesenfeld et al., 1996). Im Gegensatz zu den IFN- γ -produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen stieg bei den IL-17 produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nur die absolute Zahl der Zellen an, so dass der relative Anstieg adäquat zur Erhöhung aller CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen war. So scheint das weniger immunsuppressive Milieu in diesen Tieren eher die IFN- γ -Produktion als die IL-17-Expression der T-Zellen zu beeinflussen. In Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Stumhofer et al., 2006) war die Zahl IFN- γ -exprimierender T-Zellen etwa 10-fach höher als die Zahl IL-17-produzierender T-Zellen. Dies wurde auch in dieser Arbeit sowohl für Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Tiere als auch für gp130^{fl/fl} Mäuse gezeigt. Weiterhin stellten Guiton et al. (2010) fest, dass IL-17 im Gehirn chronisch infizierter Tiere sowohl die Entzündungsreaktion verstärkt, als auch die Zahl der Parasiten im Gehirn erhöht (Guiton et al., 2010). Aufbauend auf diesen Arbeiten ist es sehr wahrscheinlich, dass auch in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen die erhöhten IFN- γ - und IL-17-Werte zu einer verstärkten Inflammation, der erhöhten Parasitenbelastung und letztendlich zur gesteigerten Letalität beitragen.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Daten, dass auch Neuronen einen wichtigen Beitrag zur Parasitenkontrolle und zum Überleben der TE leisten und dass diese Zellen keineswegs nur als Zielzellen des Parasiten anzusehen sind.

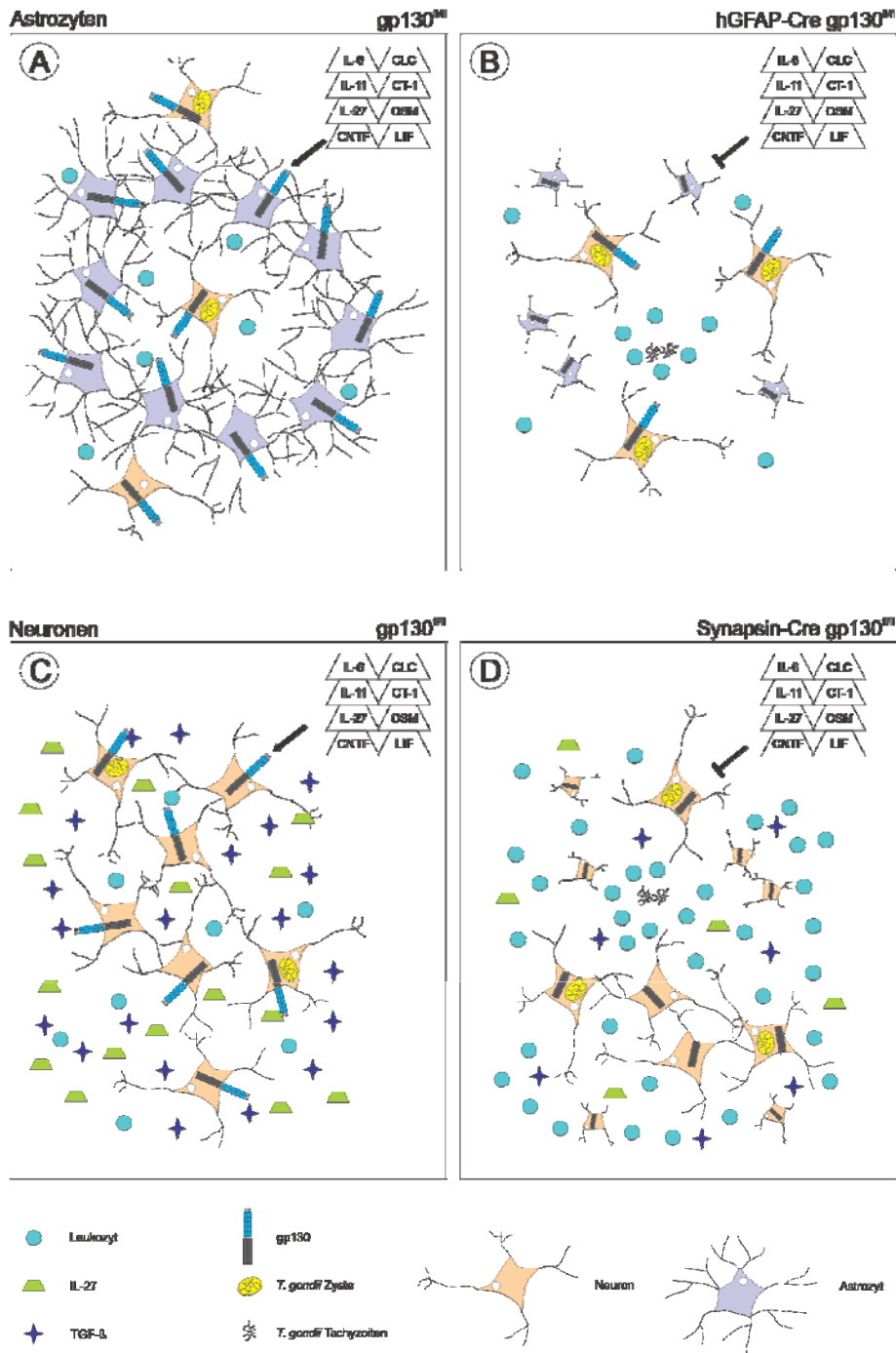


Abb. 30 Zusammenfassende Darstellung der *in vivo* Ergebnisse

A Ausbildung einer Astrogliose in $gp130^{fl/fl}$ Kontrollmäusen nach Infektion mit *T. gondii* **B** Astrozytenverlust, verminderte Parasitenkontrolle und Hyperinflammation in Gehirnen der $hGFAP-Cre\ gp130^{fl/fl}$ Mäuse **C** $gp130$ -abhängige Hochregulation der IL-27- und TGF- β -Expression und normale Parasitenkontrolle in $gp130^{fl/fl}$ Kontrollmäusen **D** gestörte Parasitenkontrolle, Verlust von Neuronen und Hyperinflammation, sowie verminderte Expression anti-inflammatorischer Zytokine in Gehirnen der *T. gondii*-infizierten $Synapsin-Cre\ gp130^{fl/fl}$ Mäuse

5 Literaturverzeichnis

Aliberti, J., C. Serhan, and A. Sher. 2002. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Exp. Med.* 196: 1253-1262.

Aloisi, F., S. Rosa, U. Testa, P. Bonsi, G. Russo, C. Peschle, and G. Levi. 1994. Regulation of leukemia inhibitory factor synthesis in cultured human astrocytes. *J. Immunol.* 152: 5022-5031.

Ambroise-Thomas, P. and H. Pelloux. 1993. Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol. Today* 9: 61-63.

Arikan, A.A., B. Yu, M.A. Mastrangelo, and D.J. Tweardy. 2006. Interleukin-6 treatment reverses apoptosis and blunts susceptibility to intraperitoneal bacterial challenge following hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 34: 771-777.

Asensi, V., E. Valle, A. Meana, J. Fierer, A. Celada, V. Alvarez, J. Paz, E. Coto, J.A. Carton, J.A. Maradona, A. Dieguez, J. Sarasua, M.G. Ocana, and J.M. Arribas. 2004. In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect. Immun.* 72: 3823-3828.

Babon, J.J., N.J. Kershaw, J.M. Murphy, L.N. Varghese, A. Laktyushin, S.N. Young, I.S. Lucet, R.S. Norton, and N.A. Nicola. 2012. Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity. *Immunity*.

Bajenaru, M.L., Y. Zhu, N.M. Hedrick, J. Donahoe, L.F. Parada, and D.H. Gutmann. 2002. Astrocyte-specific inactivation of the neurofibromatosis 1 gene (NF1) is insufficient for astrocytoma formation. *Mol. Cell Biol.* 22: 5100-5113.

Barnabe-Heider, F., J.A. Wasylska, K.J. Fernandes, C. Porsche, M. Sendtner, D.R. Kaplan, and F.D. Miller. 2005. Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48: 253-265.

Bazan, J.F. 1991. Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 7: 197-208.

Berdoy, M., J.P. Webster, and D.W. Macdonald. 2000. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc. Biol. Sci.* 267: 1591-1594.

- Berenreiterova, M., J. Flegr, A. A. Kubena, and P. Nemeč. 2011. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis. *PLoS. One.* 6: e28925.
- Betz, U. A., W. Bloch, B. M. van den, K. Yoshida, T. Taga, T. Kishimoto, K. Addicks, K. Rajewsky, and W. Müller. 1998. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J. Exp. Med.* 188: 1955-1965.
- Bewick, V., L. Cheek, and J. Ball. 2004. Statistics review 12: survival analysis. *Crit Care* 8: 389-394.
- Bonni, A., Y. Sun, M. Nadal-Vicens, A. Bhatt, D. A. Frank, I. Rozovsky, N. Stahl, G. D. Yancopoulos, and M. E. Greenberg. 1997. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278: 477-483.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova, and K. C. Garcia. 2003. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300: 2101-2104.
- Bowie, W. R., A. S. King, D. H. Werker, J. L. Isaac-Renton, A. Bell, S. B. Eng, and S. A. Marion. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. *Lancet* 350: 173-177.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brenier-Pinchart, M. P., E. Blanc-Gonnet, P. N. Marche, F. Berger, F. Durand, P. Mbroise-Thomas, and H. Pelloux. 2004. Infection of human astrocytes and glioblastoma cells with *Toxoplasma gondii*: monocyte chemotactic protein-1 secretion and chemokine expression in vitro. *Acta Neuropathol.* 107: 245-249.
- Bugga, L., R. A. Gadiant, K. Kwan, C. L. Stewart, and P. H. Patterson. 1998. Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J. Neurobiol.* 36: 509-524.
- Butcher, B. A., B. A. Fox, L. M. Rommereim, S. G. Kim, K. J. Maurer, F. Yarovinsky, D. R. Herbert, D. J. Bzik, and E. Y. Denkers. 2011. *Toxoplasma gondii* rho-trypan kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS. Pathog.* 7: e1002236.
- Butzkueven, H., J. G. Zhang, M. Soilu-Hanninen, H. Hochrein, F. Chionh, K. A. Shipham, B. Emery, A. M. Turnley, S. Petratos, M. Ernst, P. F. Bartlett, and T. J. Kilpatrick. 2002. LIF

receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat. Med.* 8: 613-619.

Buzoni-Gatel,D., H.Debbabi, F.J.Mennechet, V.Martin, A.C.Lepage, J.D.Schwartzman, and L.H.Kasper. 2001. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120: 914-924.

Cameron,H.A., T.G.Hazel, and R.D.McKay. 1998. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.* 36: 287-306.

Channon,J.Y., R.M.Seguin, and L.H.Kasper. 2000. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infect. Immun.* 68: 4822-4826.

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

Chow,D.C., L.Brevnova, X.L.He, M.M.Martick, A.Bankovich, and K.C.Garcia. 2002. A structural template for gp130-cytokine signaling assemblies. *Biochim. Biophys. Acta* 1592: 225-235.

Coisne,C., C.Faveeuw, Y.Delplace, L.Dehouck, F.Miller, R.Cecchelli, and B.Dehouck. 2006. Differential expression of selectins by mouse brain capillary endothelial cells in vitro in response to distinct inflammatory stimuli. *Neurosci. Lett.* 392: 216-220.

Collazo,C.M., G.S.Yap, S.Hieny, P.Caspar, C.G.Feng, G.A.Taylor, and A.Sher. 2002. The function of gamma interferon-inducible GTP-binding protein IGTP in host resistance to *Toxoplasma gondii* is Stat1 dependent and requires expression in both hematopoietic and nonhematopoietic cellular compartments. *Infect. Immun.* 70: 6933-6939.

Contreras-Ochoa,C.O., A.Lagunas-Martinez, J.Belkind-Gerson, and D.Correa. 2012. *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. *Parasitol. Res.*

Courret,N., S.Darche, P.Sonigo, G.Milon, D.Buzoni-Gatel, and I.Tardieux. 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107: 309-316.

Croker,B.A., H.Kiu, and S.E.Nicholson. 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19: 414-422.

Croker,B.A., D.L.Krebs, J.G.Zhang, S.Wormald, T.A.Willson, E.G.Stanley, L.Robb, C.J.Greenhalgh, I.Forster, B.E.Clausen, N.A.Nicola, D.Metcalf, D.J.Hilton,

A.W.Roberts, and W.S.Alexander. 2003. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat. Immunol.* 4: 540-545.

Deckert,M., S.Lutjen, C.E.Leuker, L.Y.Kwok, A.Strack, W.Muller, N.Wagner, and D.Schluter. 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: 1418-1428.

Deckert,M., J.D.Sedgwick, E.Fischer, and D.Schluter. 2006. Regulation of microglial cell responses in murine *Toxoplasma* encephalitis by CD200/CD200 receptor interaction. *Acta Neuropathol.* 111: 548-558.

Deckert-Schluter,M., S.Albrecht, H.Hof, O.D.Wiestler, and D.Schluter. 1995. Dynamics of the intracerebral and splenic cytokine mRNA production in *Toxoplasma gondii*-resistant and -susceptible congenic strains of mice. *Immunology* 85: 408-418.

Deckert-Schluter,M., H.Bluethmann, N.Kaefer, A.Rang, and D.Schluter. 1999. Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine *Toxoplasma* encephalitis. *Am. J. Pathol.* 154: 1549-1561.

Dellacasa-Lindberg,I., J.M.Fuks, R.B.Arrighi, H.Lambert, R.P.Wallin, B.J.Chambers, and A.Barragan. 2011. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 79: 3046-3052.

Diveu,C., M.J.McGeachy, K.Boniface, J.S.Stumhofer, M.Sathe, B.Joyce-Shaikh, Y.Chen, C.M.Tato, T.K.McClanahan, M.R.de Waal, C.A.Hunter, D.J.Cua, and R.A.Kastelein. 2009. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J. Immunol.* 182: 5748-5756.

Dubey,J.P., L.R.Ferreira, J.Martins, and R.McLeod. 2012. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology* 139: 1-13.

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

Dubremetz,J.F. 1998. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol.* 6: 27-30.

- Dunay, I.R., A. Fuchs, and L.D. Sibley. 2010. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect. Immun.* 78: 1564-1570.
- Ensoli, F., V. Fiorelli, M. DeCristofaro, M.D. Santini, A. Novi, B. Vannelli, C.J. Thiele, G. Luzi, and F. Aiuti. 1999. Inflammatory cytokines and HIV-1-associated neurodegeneration: oncostatin-M produced by mononuclear cells from HIV-1-infected individuals induces apoptosis of primary neurons. *J. Immunol.* 162: 6268-6277.
- Escary, J.L., J. Perreau, D. Dumenil, S. Ezine, and P. Brulet. 1993. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 363: 361-364.
- Fentress, S.J., M.S. Behnke, I.R. Dunay, M. Mashayekhi, L.M. Rommereim, B.A. Fox, D.J. Bzik, G.A. Taylor, B.E. Turk, C.F. Lichti, R.R. Townsend, W. Qiu, R. Hui, W.L. Beatty, and L.D. Sibley. 2010. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host. Microbe* 8: 484-495.
- Ferguson, D.J. and W.M. Hutchison. 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* 73: 483-491.
- Ferguson, D.J., W.M. Hutchison, and E. Pettersen. 1989. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Parasitol. Res.* 75: 599-603.
- Feustel, S., M. Meissner, and O. Liesenfeld. 2012. *Toxoplasma gondii* and the blood-brain barrier. *Virulence.* 3.
- Fischer, H.G., A.K. Bielinsky, B. Nitzgen, W. Daubener, and U. Hadding. 1993. Functional dichotomy of mouse microglia developed in vitro: differential effects of macrophage and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on cytokine secretion and antitoxoplasmic activity. *J. Neuroimmunol.* 45: 193-201.
- Fischer, H.G., B. Nitzgen, G. Reichmann, and U. Hadding. 1997. Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. *Eur. J. Immunol.* 27: 1539-1548.
- Flegr, J. 2007. Effects of toxoplasma on human behavior. *Schizophr. Bull.* 33: 757-760.
- Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J.J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, M.B. Das, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchemereau, and S. Lebecque. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal

cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* 183: 2593-2603.

Frenkel, J.K. 1988. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today* 4: 273-278.

Frenkel, J.K., J.P. Dubey, and N.L. Miller. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167: 893-896.

Freyre, A., J.P. Dubey, D.D. Smith, and J.K. Frenkel. 1989. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J. Parasitol.* 75: 750-755.

Fujigaki, S., K. Saito, M. Takemura, N. Maekawa, Y. Yamada, H. Wada, and M. Seishima. 2002. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 70: 779-786.

Gavrilescu, L.C. and E.Y. Denkers. 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 167: 902-909.

Gazzinelli, R., Y. Xu, S. Hieny, A. Cheever, and A. Sher. 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 149: 175-180.

Gazzinelli, R.T., F.T. Hakim, S. Hieny, G.M. Shearer, and A. Sher. 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: 286-292.

Gazzinelli, R.T., M. Wysocka, S. Hieny, T. Scharon-Kersten, A. Cheever, R. Kuhn, W. Muller, G. Trinchieri, and A. Sher. 1996. 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.

Goebel, S., U. Gross, and C.G. Luder. 2001. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *J. Cell Sci.* 114: 3495-3505.

Gresser, I., M. Aguet, L. Morel-Maroger, D. Woodrow, F. Puvion-Dutilleul, J.C. Guillon, and C. Maury. 1981. Electrophoretically pure mouse interferon inhibits growth, induces liver and kidney lesions, and kills suckling mice. *Am. J. Pathol.* 102: 396-402.

Gross, 1994, Toxoplasmose. Immunologische und molekulare Parasitologie, Gustav-Fischer Verlag, S. 83-103

- Guan,H., M.Moretto, D.J.Bzik, J.Gigley, and I.A.Khan. 2007. NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *J. Immunol.* 179: 590-596.
- Guiton,R., V.Vasseur, S.Charron, M.T.Arias, L.N.Van, D.Buzoni-Gatel, B.Ryffel, and I.Dimier-Poisson. 2010. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J. Infect. Dis.* 202: 427-435.
- Halonen,S.K., G.A.Taylor, and L.M.Weiss. 2001. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infect. Immun.* 69: 5573-5576.
- Haroon,F., K.Drogemuller, U.Handel, A.Brunn, D.Reinhold, G.Nishanth, W.Mueller, C.Trautwein, M.Ernst, M.Deckert, and D.Schluter. 2011. Gp130-dependent astrocytic survival is critical for the control of autoimmune central nervous system inflammation. *J. Immunol.* 186: 6521-6531.
- Haroon,F., U.Handel, F.Angenstein, J.Goldschmidt, P.Kreutzmann, H.Lison, K.D.Fischer, H.Scheich, W.Wetzel, D.Schluter, and E.Budinger. 2012. *Toxoplasma gondii* Actively Inhibits Neuronal Function in Chronically Infected Mice. *PLoS. One.* 7: e35516.
- Hashimoto,M., J.Nakajima-Shimada, K.Ishidoh, and T.Aoki. 2005. Gene expression profiles in response to Fas stimulation in *Trypanosoma cruzi*-infected host cells. *Int. J. Parasitol.* 35: 1587-1594.
- Heinrich,P.C., I.Behrmann, S.Haan, H.M.Hermanns, G.Muller-Newen, and F.Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374: 1-20.
- Heinrich,P.C., J.V.Castell, and T.Andus. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265: 621-636.
- Herrmann,D.C., N.Pantchev, M.G.Vrhovec, D.Barutzki, H.Wilking, A.Frohlich, C.G.Luder, F.J.Conraths, and G.Schares. 2010. Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. *Int. J. Parasitol.* 40: 285-292.
- Hippe,D., A.Weber, L.Zhou, D.C.Chang, G.Hacker, and C.G.Luder. 2009. *Toxoplasma gondii* infection confers resistance against BimS-induced apoptosis by preventing the activation and mitochondrial targeting of pro-apoptotic Bax. *J. Cell Sci.* 122: 3511-3521.
- Hisada,M., S.Kamiya, K.Fujita, M.L.Belladonna, T.Aoki, Y.Koyanagi, J.Mizuguchi, and T.Yoshimoto. 2004. Potent antitumor activity of interleukin-27. *Cancer Res.* 64: 1152-1156.

Ho-Yen,D.O., A.W.Joss, and J.M.Chatterton. 1992. Congenital toxoplasmosis. *BMJ* 305: 651-652.

Hoesche,C., A.Sauerwald, R.W.Veh, B.Krippel, and M.W.Kilimann. 1993. The 5'-flanking region of the rat synapsin I gene directs neuron-specific and developmentally regulated reporter gene expression in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 268: 26494-26502.

Holland,G.N. 2004. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am. J. Ophthalmol.* 137: 1-17.

Holmberg,K.H. and P.H.Patterson. 2006. Leukemia inhibitory factor is a key regulator of astrocytic, microglial and neuronal responses in a low-dose pilocarpine injury model. *Brain Res.* 1075: 26-35.

Holtmann,B., S.Wiese, M.Samsam, K.Grohmann, D.Pennica, R.Martini, and M.Sendtner. 2005. Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J. Neurosci.* 25: 1778-1787.

Hovelmeyer,N., S.Reissig, N.T.Xuan, P.ms-Quack, D.Lukas, A.Nikolaev, D.Schluter, and A.Waisman. 2011. A20 deficiency in B cells enhances B-cell proliferation and results in the development of autoantibodies. *Eur. J. Immunol.* 41: 595-601.

Howe,D.K. and L.D.Sibley. 1995. Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172: 1561-1566.

Hunter,C.A., C.W.Roberts, and J.Alexander. 1992. Kinetics of cytokine mRNA production in the brains of mice with progressive toxoplasmic encephalitis. *Eur. J. Immunol.* 22: 2317-2322.

Hunter,C.A., A.Villarino, D.Artis, and P.Scott. 2004. The role of IL-27 in the development of T-cell responses during parasitic infections. *Immunol. Rev.* 202: 106-114.

Ichikawa,Y. 1969. Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *J. Cell Physiol* 74: 223-234.

Israelski,D.M., F.G.Araujo, F.K.Conley, Y.Suzuki, S.Sharma, and J.S.Remington. 1989. Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis. *J. Immunol.* 142: 954-958.

Jankowsky,J.L. and P.H.Patterson. 1999. Differential regulation of cytokine expression following pilocarpine-induced seizure. *Exp. Neurol.* 159: 333-346.

- Jasper, M.J., A.S. Care, B. Sullivan, W.V. Ingman, J.D. Aplin, and S.A. Robertson. 2011. Macrophage-derived LIF and IL1 β regulate alpha(1,2)fucosyltransferase 2 (Fut2) expression in mouse uterine epithelial cells during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 84: 179-188.
- Jebbari, H., C.W. Roberts, D.J. Ferguson, H. Bluethmann, and J. Alexander. 1998. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 20: 231-239.
- Jones, C.D., N. Okhravi, P. Adamson, S. Tasker, and S. Lightman. 2000. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 634-644.
- Jones, S.A., P.J. Richards, J. Scheller, and S. Rose-John. 2005. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J. Interferon Cytokine Res.* 25: 241-253.
- Jones, S.A., J. Scheller, and S. Rose-John. 2011. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J. Clin. Invest* 121: 3375-3383.
- Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M.F. Neurath, and S. Rose-John. 2001. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.* 268: 160-167.
- Kadl, A. and N. Leitinger. 2005. The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. *Antioxid. Redox. Signal.* 7: 1744-1754.
- Kawasaki, K., Y.H. Gao, S. Yokose, Y. Kaji, T. Nakamura, T. Suda, K. Yoshida, T. Taga, T. Kishimoto, H. Kataoka, T. Yuasa, H. Norimatsu, and A. Yamaguchi. 1997. Osteoclasts are present in gp130-deficient mice. *Endocrinology* 138: 4959-4965.
- Kerr, B.J. and P.H. Patterson. 2004. Potent pro-inflammatory actions of leukemia inhibitory factor in the spinal cord of the adult mouse. *Exp. Neurol.* 188: 391-407.
- Kerr, B.J. and P.H. Patterson. 2005. Leukemia inhibitory factor promotes oligodendrocyte survival after spinal cord injury. *Glia* 51: 73-79.
- Kishimoto, T. 2006. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther.* 8 Suppl 2: S2.
- Kishimoto, T., T. Hirano, H. Kikutani, and A. Muraguchi. 1987. Delineation of human B cell differentiation: immunological and molecular characterization of human B cell differentiation factor (BSF-2). *Adv. Exp. Med. Biol.* 213: 177-188.
- Kolls, J.K. and A. Linden. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 21: 467-476.

Kristiansen, O.P. and T.Mandrup-Poulsen. 2005. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 54 Suppl 2: S114-S124.

Kwok, L.Y., S.Lutjen, S.Soltek, D.Soldati, D.Busch, M.Deckert, and D.Schluter. 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: 1949-1957.

Lachenmaier, S.M., M.A.Deli, M.Meissner, and O.Liesenfeld. 2011. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 232: 119-130.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lambert, H., N.Hitziger, I.Dellacasa, M.Svensson, and A.Barragan. 2006. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol.* 8: 1611-1623.

Lamberton, P.H., C.A.Donnely, and J.P.Webster. 2008. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. *Parasitology* 135: 1143-1150.

Lang, R., A.L.Pauleau, E.Parganas, Y.Takahashi, J.Mages, J.N.Ihle, R.Rutschman, and P.J.Murray. 2003. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat. Immunol.* 4: 546-550.

Latchman, D.S. 1999. Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *Int. J. Exp. Pathol.* 80: 189-196.

Lehmann, T., P.L.Marcet, D.H.Graham, E.R.Dahl, and J.P.Dubey. 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 11423-11428.

Leiriao, P., S.S.Albuquerque, S.Corso, G.J.van Gemert, R.W.Sauerwein, A.Rodriguez, S.Giordano, and M.M.Mota. 2005. HGF/MET signalling protects Plasmodium-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol.* 7: 603-609.

Liberto, C.M., P.J.Albrecht, L.M.Herx, V.W.Yong, and S.W.Levison. 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* 89: 1092-1100.

Liesenfeld, O., J.Kosek, J.S.Remington, and Y.Suzuki. 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 184: 597-607.

- Lindsay,D.S., J.P.Dubey, B.L.Blagburn, and M.Toivio-Kinnucan. 1991. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J. Parasitol.* 77: 126-132.
- Linker,R.A., F.Luhder, K.J.Kallen, D.H.Lee, B.Engelhardt, S.Rose-John, and R.Gold. 2008. IL-6 transsignalling modulates the early effector phase of EAE and targets the blood-brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 205: 64-72.
- Liu,H. and C.Rohowsky-Kochan. 2011. Interleukin-27-mediated suppression of human Th17 cells is associated with activation of STAT1 and suppressor of cytokine signaling protein 1. *J. Interferon Cytokine Res.* 31: 459-469.
- Livak,K.J. and T.D.Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lu,F., S.Huang, and L.H.Kasper. 2004. CD4+ T cells in the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 72: 4966-4972.
- Luder,C.G., M.Giraldo-Velasquez, M.Sendtner, and U.Gross. 1999. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp. Parasitol.* 93: 23-32.
- Luft,B.J., R.Hafner, A.H.Korzun, C.Leport, D.Antoniskis, E.M.Bosler, D.D.Bourland, III, R.Uttamchandani, J.Fuhrer, J.Jacobson, and . 1993. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. *N. Engl. J. Med.* 329: 995-1000.
- Luft,B.J. and J.S.Remington. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15: 211-222.
- Lyons,R.E., J.P.Anthony, D.J.Ferguson, N.Byrne, J.Alexander, F.Roberts, and C.W.Roberts. 2001. Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor beta and a protective role for interleukin-6. *Infect. Immun.* 69: 2589-2595.
- Malatesta,P., M.A.Hack, E.Hartfuss, H.Kettenmann, W.Klinkert, F.Kirchhoff, and M.Gotz. 2003. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37: 751-764.
- Malik,N., J.C.Kallestad, N.L.Gunderson, S.D.Austin, M.G.Neubauer, V.Ochs, H.Marquardt, J.M.Zarling, M.Shoyab, C.M.Wei, and . 1989. Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol. Cell Biol.* 9: 2847-2853.

Martens,S., I.Parvanova, J.Zerrahn, G.Griffiths, G.Schell, G.Reichmann, and J.C.Howard. 2005. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS. Pathog.* 1: e24.

Masocha,W. and K.Kristensson. 2012. Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence.* 3.

Melzer,T., A.Duffy, L.M.Weiss, and S.K.Halonen. 2008. The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for toxoplasma vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infect. Immun.* 76: 4883-4894.

Miller-Hance,W.C., M.LaCorbiere, S.J.Fuller, S.M.Evans, G.Lyons, C.Schmidt, J.Robbins, and K.R.Chien. 1993. In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation. *J. Biol. Chem.* 268: 25244-25252.

Montoya,J.G. and O.Liesenfeld. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976.

Moore,K.J., S.J.Turco, and G.Matlashewski. 1994. *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. *J. Leukoc. Biol.* 55: 91-98.

Mordue,D.G., N.Desai, M.Dustin, and L.D.Sibley. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 190: 1783-1792.

Morisaki,J.H., J.E.Heuser, and L.D.Sibley. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 6): 2457-2464.

Naka,T., N.Nishimoto, and T.Kishimoto. 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3: S233-S242.

Nakashima,K., S.Wiese, M.Yanagisawa, H.Arakawa, N.Kimura, T.Hisatsune, K.Yoshida, T.Kishimoto, M.Sendtner, and T.Tagu. 1999. Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J. Neurosci.* 19: 5429-5434.

Nash,P.B., M.B.Purner, R.P.Leon, P.Clarke, R.C.Duke, and T.J.Curiel. 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* 160: 1824-1830.

Nicolle C, Manceaux L 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Acad Sci* 148: 369

- Nolte,C., M.Matyash, T.Pivneva, C.G.Schipke, C.Ohlemeyer, U.K.Hanisch, F.Kirchhoff, and H.Kettenmann. 2001. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33: 72-86.
- Oberdorfer,C., O.Adams, C.R.MacKenzie, C.J.De Groot, and W.Daubener. 2003. Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527: 15-26.
- Ochiai,W., M.Yanagisawa, T.Takizawa, K.Nakashima, and T.Taga. 2001. Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells involving cardiotrophin-1-induced activation of STAT3. *Cytokine* 14: 264-271.
- Ohsumi,J., K.Miyadai, I.Kawashima, H.Ishikawa-Ohsumi, S.Sakakibara, K.Mita-Honjo, and Y.Takiguchi. 1991. Adipogenesis inhibitory factor. A novel inhibitory regulator of adipose conversion in bone marrow. *FEBS Lett.* 288: 13-16.
- Ong,Y.C., M.L.Reese, and J.C.Boothroyd. 2010. Toxoplasma rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J. Biol. Chem.* 285: 28731-28740.
- Pappas,G., N.Roussos, and M.E.Falagas. 2009. Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39: 1385-1394.
- Passos,S.T., J.S.Silver, A.C.O'Hara, D.Sehy, J.S.Stumhofer, and C.A.Hunter. 2010. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J. Immunol.* 184: 1776-1783.
- Patrat-Delon,S., J.P.Gangneux, S.Lavoue, B.Lelong, C.Guiguen, T.Y.le, and F.Robert-Gangneux. 2010. Correlation of parasite load determined by quantitative PCR to clinical outcome in a heart transplant patient with disseminated toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 48: 2541-2545.
- Paul,S.R., F.Bennett, J.A.Calvetti, K.Kelleher, C.R.Wood, R.M.O'Hara, Jr., A.C.Leary, B.Sibley, S.C.Clark, D.A.Williams, and . 1990. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 7512-7516.
- Pennica,D., K.J.Shaw, T.A.Swanson, M.W.Moore, D.L.Shelton, K.A.Zioncheck, A.Rosenthal, T.Taga, N.F.Paoni, and W.I.Wood. 1995. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J. Biol. Chem.* 270: 10915-10922.

- Peterson,P.K., G.Gekker, S.Hu, and C.C.Chao. 1995. Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. *J. Infect. Dis.* 171: 516-518.
- Pfefferkorn,E.R., S.E.Borotz, and R.F.Nothingel. 1993. Mutants of *Toxoplasma gondii* resistant to atovaquone (566C80) or decoquinate. *J. Parasitol.* 79: 559-564.
- Pleyer et al., *Der Ophthalmologe* 2007 104:603-616; Springer Medizin Verlag 2007
- Pober,J.S. and W.C.Sessa. 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 803-815.
- Ransohoff,R.M., P.Kivisakk, and G.Kidd. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 569-581.
- Remington,J.S. and D.Desmots. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* W.B. Saunders, Philadelphia.
- Rempe,D., G.Vangeison, J.Hamilton, Y.Li, M.Jepson, and H.J.Federoff. 2006. Synapsin I Cre transgene expression in male mice produces germline recombination in progeny. *Genesis.* 44: 44-49.
- Repovic,P. and E.N.Benveniste. 2002. Prostaglandin E2 is a novel inducer of oncostatin-M expression in macrophages and microglia. *J. Neurosci.* 22: 5334-5343.
- Rozenfeld,C., R.Martinez, S.Seabra, C.Sant'anna, J.G.Goncalves, M.Bozza, V.Moura-Neto, and S.W.De. 2005. *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia. *Am. J. Pathol.* 167: 1021-1031.
- Sabin AB, Olitsky PK 1937. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science* 85: 336-338.
- Scheller,J. and S.Rose-John. 2006. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med. Microbiol. Immunol.* 195: 173-183.
- Schluter,D., D.Bertsch, K.Frei, S.B.Hubers, O.D.Wiestler, H.Hof, A.Fontana, and M.Deckert-Schluter. 1998. Interferon-gamma antagonizes transforming growth factor-beta2-mediated immunosuppression in murine *Toxoplasma* encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 81: 38-48.
- Schluter,D., M.Deckert, H.Hof, and K.Frei. 2001. *Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon-

and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii*. *Infect. Immun.* 69: 7889-7893.

Senaldi,G., M.Stolina, J.Guo, R.Faggioni, S.McCabe, S.A.Kaufman, G.Van, W.Xu, F.A.Fletcher, T.Boone, M.S.Chang, U.Sarmiento, and R.C.Cattley. 2002. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J. Immunol.* 168: 5690-5698.

Senaldi,G., B.C.Varnum, U.Sarmiento, C.Starnes, J.Lile, S.Scully, J.Guo, G.Elliott, J.McNinch, C.L.Shaklee, D.Freeman, F.Manu, W.S.Simonet, T.Boone, and M.S.Chang. 1999. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 11458-11463.

Shi,Y., W.Wang, P.A.Yourey, S.Gohari, D.Zukauskas, J.Zhang, S.Ruben, and R.F.Alderson. 1999. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 132-138.

Shin,H.I., P.Divieti, N.A.Sims, T.Kobayashi, D.Miao, A.C.Karaplis, R.Baron, R.Bringhurst, and H.M.Kronenberg. 2004. Gp130-mediated signaling is necessary for normal osteoblastic function in vivo and in vitro. *Endocrinology* 145: 1376-1385.

Sibley,L.D. and J.C.Boothroyd. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359: 82-85.

Sibley,L.D., I.R.Niesman, S.F.Parmley, and M.F.Cesbron-Delauw. 1995. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 4): 1669-1677.

Sibley,L.D., E.Weidner, and J.L.Krahenbuhl. 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315: 416-419.

Silver,J.S., J.S.Stumhofer, S.Passos, M.Ernst, and C.A.Hunter. 2011. IL-6 mediates the susceptibility of glycoprotein 130 hypermorphs to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 187: 350-360.

Sims,N.A. and N.C.Walsh. 2010. GP130 cytokines and bone remodelling in health and disease. *BMB. Rep.* 43: 513-523.

Slaets,H., J.J.Hendriks, P.Stinissen, T.J.Kilpatrick, and N.Hellings. 2010. Therapeutic potential of LIF in multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* 16: 493-500.

Sodenkamp,J., J.Behrends, I.Forster, W.Muller, S.Ehlers, and C.Holscher. 2011. gp130 on macrophages/granulocytes modulates inflammation during experimental tuberculosis. *Eur. J. Cell Biol.* 90: 505-514.

- Splendore A 1908. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 3: 109-112.
- Stenzel, W., S. Soltek, D. Schluter, and M. Deckert. 2004. The intermediate filament GFAP is important for the control of experimental murine *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess and *Toxoplasma encephalitis*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63: 631-640.
- Stone, T.W. 2001. Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicon* 39: 61-73.
- Strack, A., V.C. Asensio, I.L. Campbell, D. Schluter, and M. Deckert. 2002. Chemokines are differentially expressed by astrocytes, microglia and inflammatory leukocytes in *Toxoplasma encephalitis* and critically regulated by interferon-gamma. *Acta Neuropathol.* 103: 458-468.
- Streetz, K.L., T. Wustefeld, C. Klein, K.J. Kallen, F. Tronche, U.A. Betz, G. Schutz, M.P. Manns, W. Muller, and C. Trautwein. 2003. Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury. *Gastroenterology* 125: 532-543.
- Stumhofer, J.S., A. Laurence, E.H. Wilson, E. Huang, C.M. Tato, L.M. Johnson, A.V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, C.J. Saris, J.J. O'Shea, L. Hennighausen, M. Ernst, and C.A. Hunter. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* 7: 937-945.
- Surace, E.I., A. Strickland, R.A. Hess, D.H. Gutmann, and C.K. Naughton. 2006. Tslc1 (nectin-like molecule-2) is essential for spermatozoa motility and male fertility. *J. Androl* 27: 816-825.
- Suzuki, Y., S. Rani, O. Liesenfeld, T. Kojima, S. Lim, T.A. Nguyen, S.A. Dalrymple, R. Murray, and J.S. Remington. 1997. Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infect. Immun.* 65: 2339-2345.
- Suzuki, Y., Q. Sa, M. Gehman, and E. Ochiai. 2011. Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain. *Expert. Rev. Mol. Med.* 13: e31.
- Suzuki, Y., A. Sher, G. Yap, D. Park, L.E. Neyer, O. Liesenfeld, M. Fort, H. Kang, and E. Gufwoli. 2000. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 164: 5375-5382.
- Tabernerero, A., J.M. Medina, and C. Giaume. 2006. Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *J. Neurochem.* 99: 1049-1061.

- Taylor,G.A., C.G.Feng, and A.Sher. 2004. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 100-109.
- Tenorio,E.P., J.Fernandez, C.Castellanos, J.E.Olguin, and R.Saavedra. 2011. CD4+ Foxp3+ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *Eur. J. Immunol.* 41: 3529-3541.
- Tenter,A.M., A.R.Heckerroth, and L.M.Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30: 1217-1258.
- Toyonaga,T., O.Hino, S.Sugai, S.Wakasugi, K.Abe, M.Shichiri, and K.Yamamura. 1994. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91: 614-618.
- Trinchieri,G. 2010. Type I interferon: friend or foe? *J. Exp. Med.* 207: 2053-2063.
- Trouillas,M., C.Saucourt, B.Guillotin, X.Gauthereau, J.L.Taupin, J.F.Moreau, and H.Boeuf. 2009. The LIF cytokine: towards adulthood. *Eur. Cytokine Netw.* 20: 51-62.
- Uemura,A., T.Takizawa, W.Ochiai, M.Yanagisawa, K.Nakashima, and T.Taga. 2002a. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 18: 1-7.
- Uemura,A., T.Takizawa, W.Ochiai, M.Yanagisawa, K.Nakashima, and T.Taga. 2002b. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 18: 1-7.
- Varon,S., M.Manthorpe, and R.Adler. 1979. Cholinergic neuronotrophic factors: I. Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Res.* 173: 29-45.
- Villarino,A., L.Hibbert, L.Lieberman, E.Wilson, T.Mak, H.Yoshida, R.A.Kastelein, C.Saris, and C.A.Hunter. 2003. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity.* 19: 645-655.
- Villarino,A.V., J.S.Stumhofer, C.J.Saris, R.A.Kastelein, F.J.de Sauvage, and C.A.Hunter. 2006. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J. Immunol.* 176: 237-247.
- Vlotides,G., K.Zitzmann, G.K.Stalla, and C.J.Auernhammer. 2004. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15: 325-336.

Wallace,P.M., J.F.MacMaster, K.A.Rouleau, T.J.Brown, J.K.Loy, K.L.Donaldson, and A.F.Wahl. 1999. Regulation of inflammatory responses by oncostatin M. *J. Immunol.* 162: 5547-5555.

Weiss,T.W., A.L.Samson, B.Niego, P.B.Daniel, and R.L.Medcalf. 2006. Oncostatin M is a neuroprotective cytokine that inhibits excitotoxic injury in vitro and in vivo. *FASEB J.* 20: 2369-2371.

Whitmarsh,R.J., C.M.Gray, B.Gregg, D.A.Christian, M.J.May, P.J.Murray, and C.A.Hunter. 2011. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. *Cell Host. Microbe* 10: 224-236.

Wilson,E.H. and C.A.Hunter. 2004. The role of astrocytes in the immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *Int. J. Parasitol.* 34: 543-548.

Wirtz,S., I.Tubbe, P.R.Galle, H.J.Schild, M.Birkenbach, R.S.Blumberg, and M.F.Neurath. 2006. Protection from lethal septic peritonitis by neutralizing the biological function of interleukin 27. *J. Exp. Med.* 203: 1875-1881.

Xu,Y., N.J.Kershaw, C.S.Luo, P.Soo, M.J.Pocock, P.E.Czabotar, D.J.Hilton, N.A.Nicola, T.P.Garrett, and J.G.Zhang. 2010. Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 285: 21214-21218.

Yamada,T., T.Tomita, L.M.Weiss, and A.Orlofsky. 2011. *Toxoplasma gondii* inhibits granzyme B-mediated apoptosis by the inhibition of granzyme B function in host cells. *Int. J. Parasitol.* 41: 595-607.

Yasukawa,H., M.Hoshijima, Y.Gu, T.Nakamura, S.Pradervand, T.Hanada, Y.Hanakawa, A.Yoshimura, J.Ross, Jr., and K.R.Chien. 2001. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J. Clin. Invest* 108: 1459-1467.

Yoshida,K., T.Tagata, M.Saito, S.Suematsu, A.Kumanogoh, T.Tanaka, H.Fujiwara, M.Hirata, T.Yamagami, T.Nakahata, T.Hirabayashi, Y.Yoneda, K.Tanaka, W.Z.Wang, C.Mori, K.Shiota, N.Yoshida, and T.Kishimoto. 1996a. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 407-411.

Yoshida,K., T.Tagata, M.Saito, S.Suematsu, A.Kumanogoh, T.Tanaka, H.Fujiwara, M.Hirata, T.Yamagami, T.Nakahata, T.Hirabayashi, Y.Yoneda, K.Tanaka, W.Z.Wang, C.Mori, K.Shiota, N.Yoshida, and T.Kishimoto. 1996b. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 407-411.

Yu,H., D.Pardoll, and R.Jove. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9: 798-809.

Zarling,J.M., M.Shoyab, H.Marquardt, M.B.Hanson, M.N.Lioubin, and G.J.Todaro. 1986. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83: 9739-9743.

Zhu,Y., M.I.Romero, P.Ghosh, Z.Ye, P.Charnay, E.J.Rushing, J.D.Marth, and L.F.Parada. 2001. Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes Dev.* 15: 859-876.

Zou,X., B.Bolon, J.K.Pretorius, C.Kurahara, J.McCabe, K.A.Christiansen, N.Sun, D.Duryea, O.Foreman, G.Senaldi, A.A.Itano, and G.Siu. 2009. Neonatal death in mice lacking cardiotrophin-like cytokine is associated with multifocal neuronal hypoplasia. *Vet. Pathol.* 46: 514-519.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema: *Funktion der astrozytär und neuronal exprimierten Rezeptoruntereinheit gp130 bei der murinen Toxoplasma-Enzephalitis* selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 29.05.2012

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ulrike Händel
Geburtsdatum: 22.03.1973
Geburtsort: Magdeburg
Adresse: Graubestraße 26, 39116 Magdeburg

Schulische Ausbildung

09/1979 – 09/1989 Zehnklassige Allgemeinbildende Polytechnische
Oberschule „Walter Kaßner“ in Magdeburg, Abschluss:
Realschulabschluss

08/1995 – 08/1998 Schule des zweiten Bildungsweges, Abschluss: Abitur

Berufsausbildung

09/1989 – 08/1992 Berufsfachschule der Medizinischen Akademie
Magdeburg, Abschluss: staatl. geprüfte Krankenschwester

Hochschulausbildung

10/1998 – 09/2000 Studium im Fachbereich Humanbiologie an der Ernst-
Moritz-Arndt Universität Greifswald, Abschluss:
Vordiplom

10/2000 – 06/2005 Studium im Fachbereich Neurobiologie an der Otto-von-
Guericke Universität Magdeburg, Abschluss: Diplom-
Biologin

Thema der Diplomarbeit: *Bestimmung der Funktion
GABAerger Interneurone während der
Netzwerkentstehung in embryonalen neokortikalen
Zellkulturen*

seit 2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Otto-von-Guericke
Universität Magdeburg, Institut für Medizinische
Mikrobiologie,

Promotionsarbeit: *Funktion der astrozytär und neuronal
exprimierten Rezeptoruntereinheit gp130 bei der murinen
Toxoplasma-Enzephalitis*