

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung des Krüppel-like Faktor 4 (Klf4) bei der oralen Infektion  
mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Caroline Bartelheimer, geb. Nobre Gomes

aus Fortaleza/Brasilien

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld  
2. Prof. Dr. med. A. Burchert  
3. Prof. Dr. med. D. Reinhold

Datum der Promotion: 01.02.2013

## **Danksagung**

*"Siempre hago lo que no puedo hacer, para que yo pueda aprender a hacerlo."*

(Pablo Picasso)

„Ich tue immer, was ich nicht kann, um zu lernen, wie es geht“

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Oliver Liesenfeld, der mir die Möglichkeit gab, in Deutschland zu promovieren und mich stets mit seiner wohlwollenden und freundschaftlichen Unterstützung zum Schreiben dieser Arbeit motivierte.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Dirk Carstanjen, der mir bei der Erstellung der Arbeit jederzeit kompetent und hilfreich zur Seite stand.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine wissenschaftliche Forschung am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Charité durchführen zu können.

Ebenfalls geht mein spezieller Dank an Dr. Melba Muñoz, Uwe Lohmann, Dr. Lara Bajohr und Dr. Sabrina Feustel für die geduldige Unterstützung während meines Einstiegs in die experimentelle Arbeit sowie für die unzähligen motivierenden Gespräche und fachlichen Ratschläge.

Bei den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, Berit Söhl-Kielczynski und Solvy Wolke, bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Dr. Markus Heimesaat, insbesondere Michaela Wattrodt, möchte ich ebenfalls herzlich danken.

Dank auch an alle Mitarbeiter des Tierstalls für ihre Unterstützung und Hilfe.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Thomas Bartelheimer, meinem Momo, Freund, Partner und Ehemann bedanken, dessen Liebe mich über den Ozean und über alle Grenzen brachte und ohne die es diese Doktorarbeit nicht gäbe.

Dank auch an meine Familie, insbesondere meine Eltern, die mich lehrten, dass Fleiß eine wichtige Eigenschaft ist und dass der Himmel nicht die Grenze sein muss. Für die große Unterstützung und Aufmunterung während der gesamten Zeit danke ich meinen Geschwistern, meiner Familie in Deutschland und meinen Freunden.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1 Die Bedeutung der Krüppel-like-Faktoren bei Mensch und Tier.....	11
1.1.1 Krüppel-like Faktoren.....	11
1.1.2 Krüppel-like Faktor 4.....	13
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	15
1.2.1 Biologie von <i>T. gondii</i> .....	15
1.2.2 Humanmedizinische Bedeutung von <i>T. gondii</i> .....	16
1.2.3 Immunantwort gegen <i>T. gondii</i> .....	17
1.2.4 Mausmodelle der Toxoplasmose.....	18
1.2.4.1 Protektive Immunantwort nach Infektion der Maus mit 10 Zysten.....	18
1.2.4.2 Th1-Typ Immunpathologie nach oraler Infektion 100 Zysten.....	19
1.3 Fragestellung.....	21
 <b>2. Material und Methoden.....</b>	 <b>22</b>
2.1 Materialien.....	22
2.1.1 Mäuse.....	22
2.1.2 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	23
2.1.3 ELISA- und andere Kits.....	23
2.1.4 Primer und Proben.....	24
2.1.5 Enzyme und Antikörper.....	24
2.1.6 Chemikalien.....	25
2.1.7 Nährmedien und Seren.....	27
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	28

2.1.9 Geräte und Materialien.....	32
2.1.10 Plastikware.....	34
2.1.11 Software und Datenbanken.....	35
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Orale Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	35
2.2.2 Tötung der Tiere und Organentnahme.....	36
2.2.3 Histologische Methoden.....	37
2.2.3.1 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.....	37
2.2.3.2 Immunhistochemische Detektion von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	38
2.2.3.3 Auswertungen der histologischen Schnitte und Dokumentation.....	40
2.2.4 Gewinnung von Serum.....	41
2.2.5 Organkultur.....	41
2.2.6 ELISA zum Nachweis von Zytokinen und Stickoxid in Serum und Organkulturen.....	41
2.2.6.1 IL-6 und IFN- $\gamma$ .....	42
2.2.6.2 IL-17 und IL-22.....	42
2.2.7 Bestimmung der Stickoxid (NO)-Konzentration.....	43
2.2.8 Gewinnung von mononukleären Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten.....	43
2.2.9 Durchflusszytometrie.....	43
2.2.10 PCR.....	44
2.2.10.1 Isolierung von DNA.....	44
2.2.10.2 Isolierung von RNA.....	45
2.2.10.3 Quantifizierung der <i>Toxoplasma gondii</i> -DNA.....	45
2.2.10.4 Quantifizierung von IFN- $\gamma$ .....	46

2.3 Statistische Analysen.....	47
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1 Verlauf der oralen Infektion mit 10 Zysten <i>T. gondii</i> .....	48
3.1.1 Gewichtsverlust und klinische Symptome.....	48
3.1.2 Histologische Veränderungen in Ileum und Leber.....	49
3.1.3 Parasitenlast in Darm und Leber.....	53
3.1.4 Konzentrationen von Entzündungsmediatoren in Serum, Ileum und Milz.....	54
3.1.4.1 IL-6 und Stickoxid-Konzentration .....	54
3.1.4.2 IFN- $\gamma$ -Konzentration in Serum und Ileum.....	55
3.1.4.3 Konzentrationen von Th17-Zytokinen im Ileum.....	57
3.1.5 Bestimmung der Leukozytenpopulationen in mesenterialen Lymphknoten und Milz.....	58
3.1.5.1 IFN- $\gamma$ - und IL-17-Produktion durch in CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen der mesenterialen Lymphknoten.....	58
3.1.5.2 T- und B-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten.....	62
3.1.5.3 Relative Prozentzahl von Granulozyten und Ly-6C <sup>+</sup> -Monozyten in den mesenterialen Lymphknoten.....	63
3.1.5.4 Relative Prozentzahl von antigenpräsentierenden Zellen in den mesenterialen Lymphknoten.....	66
3.2 Verlauf der oralen Infektion mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> .....	68
3.2.1 Gewichtsverlust und klinische Symptome.....	68
3.2.2 Histologische Veränderungen in Ileum und Leber.....	69
3.2.3 Parasitenlast in Darm und Leber.....	73
3.2.4 Konzentrationen von Entzündungsmediatoren in Serum, Ileum	

und Milz.....	73
3.2.4.1 IL-6 und Stickoxid-Konzentration.....	74
3.2.4.2 IFN- $\gamma$ -Konzentration in Serum und Ileum.....	75
3.2.4.3 Konzentrationen von Th17-Zytokinen im Ileum.....	76
3.2.5 Bestimmung der Lymphozytenpopulationen in mesenterialen Lymphknoten und Milz.....	78
3.2.5.1 IFN- $\gamma$ und IL-17-produzierende CD4 <sup>+</sup> -Zellen der mesenterialen Lymphknoten.....	78
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>80</b>
4.1 Spielt Klf4 eine Rolle bei der Th1-Immunantwort der Maus nach oraler Infektion mit <i>T. gondii</i> ?.....	80
4.2 Spielt Klf4 eine Rolle bei der Th17-Immunantwort der Maus nach oraler Infektion mit <i>T. gondii</i> ?.....	83
4.3 Welche Bedeutung hat Klf4 für die Reifung spezifischer Zellpopulationen nach oraler Infektion mit <i>T. gondii</i> ?.....	85
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>90</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>97</b>
8.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	97
8.1.1 Abbildungsverzeichnisse.....	97



8.1.2 Tabellenverzeichnisse.....	99
8.2. Abkürzungsverzeichnis.....	100
Lebenslauf.....	105
Erklärung.....	106

## 1. Einleitung

Krüppel-like-Faktoren (Klfs) sind eine Familie von 17 Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Zellvermehrung und Kontrolle der Zelldifferenzierung spielen [1]. So ist die Reifung der roten Blutzellen [2, 3], sowie die Entwicklung der Lunge [4] und die terminale Differenzierung der Becher-Zellen im Kolon [5-8] von Klfs abhängig. Einige Mitglieder dieser Familie, darunter Klf4, Klf5, Klf6, Klf8 und Klf11, spielen darüber hinaus in der Pathobiologie von verschiedenen Tumorerkrankungen sowohl als Tumor-Supressor (u.a. kolorektales-, Magen- und Ösophaguskarzinom), als auch als Tumorpromotor (Mammakarzinom, Oropharynxkarzinom) eine Rolle [1, 7, 9]. Klf-Proteine regulieren typischerweise wichtige Aspekte zellulärer Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose [7, 10], aber auch den Gewebeaufbau [11]. Klfs scheinen darüber hinaus auch eine Rolle bei der Entwicklung von entzündlichen Erkrankungen (u.a. Vaskulitiden) zu spielen. Genaue Mechanismen dieser Rolle sind bislang jedoch nur unzureichend geklärt. Klfs beeinflussen die Expression der Zytokine TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , und regulieren die Differenzierung von Makrophagen [12].

Klf4 ist hauptsächlich an der Hemmung der Zellproliferation und der Differenzierung und Regulierung des Wachstums des Darms sowie der Haut beteiligt [5-8]. Im Immunsystem ist die Interaktion von Klf4 mit IFN- $\gamma$  nachgewiesen, da Klf4 iNOS-Promotoren, insbesondere unter Einfluss von IFN- $\gamma$  induziert [12]. Neuere unveröffentlichte Studien zeigen, dass Klf4 Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-6 und Enzyme des Arachidonsäure-Stoffwechselweges in myeloischen Zellen aktivieren kann (Dirk Carstanjen, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus kann Klf4 auch die Migration und das „Homing“ von T-Zellen regulieren [13]. Diese Studien waren aber nicht dazu angelegt, die Bedeutung von Klf4 bei entzündlichen Erkrankungen und der Abwehr von Infektionserregern zu klären.

T-Helfer (Th)17-Zellen wurden kürzlich als Mediatoren der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose und von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen erkannt [14].

Da ein möglicher Einfluß von Klf4 auf Zellenreifung und -differenzierung sowie auf die Induktion von Zytokinen beschrieben worden ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen Klf4 und protektiven bzw. pathologischen Immunantworten untersucht. Dazu kamen in-vivo- und ex-vivo-Infektionsversuche mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii* an Klf4-Wildtyp und -Knockout-Mäusen zur Anwendung.

### **1.1 Die Bedeutung der Krüppel-like-Faktoren bei Mensch und Tier**

#### **1.1.1 Krüppel-like Faktoren**

Krüppel-like Faktoren (Klfs) gehören zur Familie der Sp1-like Transkriptionsfaktoren, die mehr als 20 Mitglieder hat [6, 15]. Das Kennzeichen dieser Familie ist ein DNA-bindendes Motiv, das mehrere Zink-Finger enthält [6]. Weitere Domänen sind an der transkriptionellen Aktivierung oder Repression sowie an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt [6]. Klf-Proteine regulieren typischerweise wichtige Aspekte zellulärer Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose [7], aber auch den Gewebeaufbau [11]. Wichtige Mitglieder der Klf-Familie sind Klf1, das die Reifung der roten Blutzellen reguliert [2, 3] und Klf2, das für die Entwicklung der Lunge eine große Rolle spielt [4]. Außerdem treten Klfs als wichtige Faktoren in der Biologie der Gefäße auf, weil endotheliales Klf4 die Expression von entzündlichen Mediatoren wie Gewebsthrombokinase [16] und VCAM-1 hemmt und gleichzeitig die Expression von wichtigen Faktoren für die Integrität des Endothels wie eNOS und Thrombomodulin fördert [11]. Außerdem sind Mitglieder der Klf-Familie an den Wirkungen von VEGF und FGFs beteiligt [9].

Im Immunsystem beeinflussen Klf s die Expressionen verschiedener Schlüsselzytokine wie TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , und iNOS-abhängige proinflammatorische Effekte von IFN- $\gamma$ . Darüber hinaus werden auch Enzyme des Arachnidonsäure-Stoffwechselweges, die Differenzierung von Makrophagen, sowie die T-Zell-Migration und das „Homing“ von T-Zellen von Klf s reguliert [12, 13].

Durch ihr allgegenwärtiges Vorkommen und ihre vielfältigen Funktionen bei Menschen sind Krüppel-like Transkriptionsfaktoren mittlerweile Thema intensiver Forschung. Sie haben einen bedeutsamen Einfluss in der Entstehung unterschiedlichster Erkrankungen, u. a. embryonalen Entwicklungsstörungen, vaso-okklusive Krankheiten [17, 18], Myokardinfarkt, Schlaganfälle und PAVK [18, 19], neurodegenerativer Erkrankungen [20], Adipositas [21], Typ 2 Diabetes [22] sowie hämatologisch/onkologischen Erkrankungen. Viele weitere Erkrankungen scheinen pathogenetisch durch Klf s beeinflusst zu werden, was die Vielfalt aktueller Arbeiten über Klf s in unterschiedlichsten medizinischen Teilbereichen belegt.

Die Tabelle 1 fasst einige Funktionen, in den die KLF-Familie impliziert wurde.

<b>KLF-Mitglied</b>	<b>Zelluläre Funktion</b>
KLF1	Aktivierung der Erythropoese
KLF2	Aktivierung der Entwicklung von Blutgefäßen und Lunge und Überlebung von T-Zellen
KLF3	Funktion noch unbekannt, in erythroiden Gewebe und Gehirn exprimiert
KLF4	(*detaillierte Beschreibung siehe unten)
KLF5	Aktivierung des Zellwachstums im Darm und epithelialen Gewebe
KLF6	Mutmaßlich Tumorhemmung (ubiquitäre Expression)
KLF7	Aktivierung der Zellzyklus Arrest (ubiquitäre Expression)
KLF8	Unklare hemmende Funktion (ubiquitäre Expression)
KLF9	Aktivierung/Hemmung von Neuritenwachstum und „carcinogen“ Metabolismus (ubiquitäre Expression)

KLF10	Hemmung des Wachstums (ubiquitäre Expression)
KLF11	Hemmung des Wachstums (ubiquitäre Expression)
KLF12	Unklare Funktion (Expression in Gehirn, Niere, Leber und Lunge)
KLF13	Hemmung des Wachstums und Aktivierung/Hemmung des „carcinogen“ Metabolismus (ubiquitäre Expression)
KLF14	Aktivierung der Transkription (ubiquitäre Expression)
KLF15	Unklare Funktion (ubiquitäre Expression)
KLF16	Hemmung des „carcinogen“ Metabolismus (ubiquitäre Expression)

**Tab. 1: Die Funktionsmerkmale der KLF-Familie [9]**

### 1.1.2 Krüppel-like Faktor 4

Klf4 oder GKLf (gut-enriched Krüppel-like factor) wurde erstmalig 1996 beschrieben und ursprünglich als spezifischer epithelialer Transkriptionsfaktor angesehen [5, 11, 23]. Klf4 ist in epithelialem Gewebe des Darmes und der Haut stark exprimiert [6, 7]. Klf4 ist an der Hemmung der Zellproliferation und der terminalen Differenzierung und Regulierung des Wachstums des Darms sowie der Haut beteiligt [5-8].

Durch die Generierung von *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte die Rolle von Klf4 weiter aufgeklärt werden [7]. Der Phänotyp dieser Mäuse wird dominiert von einem Defekt der Barrierefunktion der Haut, woraus ein schneller Flüssigkeitsverlust und postnatale Letalität resultiert [6, 7]. Grund hierfür ist die Regulation von Genen der *Sprr*- und Keratinfamilien, die die Integrität der Haut regulieren [7, 8]. *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen auch einen 90%igen Verlust der Becher-Zellen in Kolon auf [6-8]. In den epithelialen Zellen des Ösophagus führt das Fehlen von Klf4 zu einer Hyperplasie und Dysplasie [24]. Die *Klf4* Expression ist bei hoher zellulärer Proliferation niedrig [25].

Neuere Studien zeigten, dass Klf4 auch die Entwicklung von pluripotenten Stammzellen [5, 26], die Regulation des Makrophagen-Differenzierungsmarkers CD11d und die Regulation

von IFN- $\gamma$  beeinflusst [12]. Auch T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) werden vom Klf4 beeinflusst [13]. Eine unveröffentlichte Arbeit zeigte, dass Klf4 Zytokingene in myeloischen Zellen transaktiviert, besonderes IL-1b, IL-6 und Enzyme des Arachnidonsäure-Stoffwechselweges. Darüber hinaus induziert die ektopische Expression von Klf4 in myeloischen Zellen die Differenzierung von naiven T-Zellen in T-Helfer (Th) 17-Zellen (Dirk Carstanjen, persönliche Mitteilung). Klf4 kann auch Promoteren von iNOS aktivieren [12]. Jedoch ist die Rolle von Klf4 bei der Inflammation noch wenig untersucht und scheint von Zelltyp abhängig zu sein. Die Tabelle 2 fasst einige Funktionen in den Klf4 impliziert wurde.

<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
Hemmung der Zellproliferation und der terminalen Differenzierung und Regulierung des Wachstums des Darms sowie der Haut	[5-8]
Regulierung von Genen der <i>Spr</i> - und Keratinfamilien	[7, 8]
Entwicklung von pluripotenten Stammzellen	[5, 26]
Regulierung des Makrophagen Differenzierungsmarkers CD11d und der Wirkung von IFN- $\gamma$	[12]
Regulierung von T-Zellen (CD8 <sup>+</sup> )	[13]
Aktivierung von Zytokinen in myeloischen Zellen (IL-1b, IL-6 und Enzyme der Arachnidonsäuresynthese)	(unveröffentlichte Beobachtungen von Dirk Carstanjen)
Aktivierung von Mikroglia Upregulation von TNF- $\alpha$ , MCP-1 und IL-6	[27]
Aktivierung von iNOS Promotern in humanem nicht aber in murinen Makrophagen	[12, 28]
Aktivierung von Cox-2-Promoteren unter LPS-Stimuli	[27]

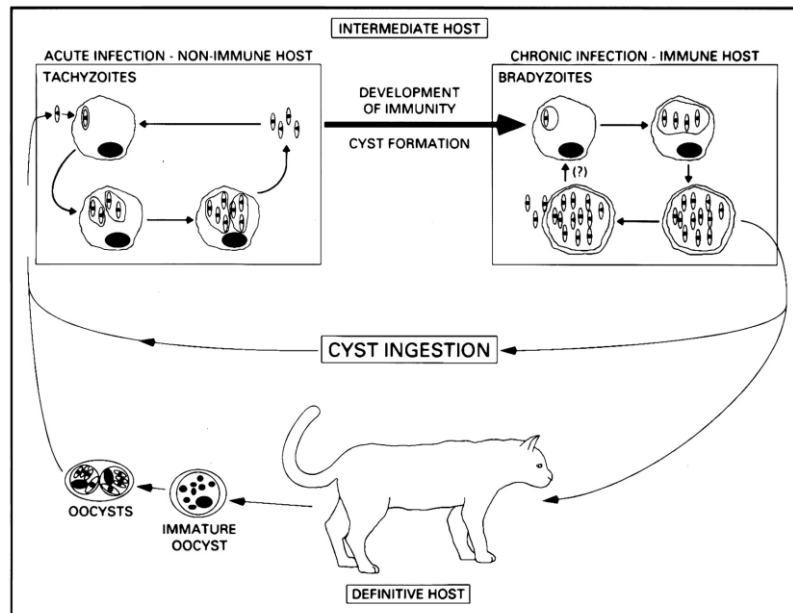
Hemmung der Inflammation durch Hemmung von TNF- $\alpha$ -Aktivierung und MCP-1 in endothelialen Zellen	[11, 29]
Differenzierung von naiven T-Zellen in T-Helfer (Th) 17-Zellen	(unveröffentlichte Beobachtungen von Dirk Carstanjen)
Hemmung von Plattenepithelkarzinom-Zellen im Ösophagus	[24]

**Tab. 2: Die Bedeutung von KLF4 im Immunsystem**

## 1.2 *Toxoplasma gondii*

### 1.2.1 Biologie von *T. gondii*

Das Protozoon *T. gondii* (1908 von Nicolle und Manceaux entdeckt [30]) verfügt über verschiedene Vermehrungsformen: Sporozoit (Oozysten), Tachyzoiten und Bradyzoiten (Gewebezysten). Die Katze ist der Endwirt von *T. gondii* [31]. Die infektiösen Oozysten werden fäkal ausgeschieden und aus mit Katzenkot kontaminierter Umwelt von Säugetieren aufgenommen, in deren Dünndarm sie sich in Form von Tachyzoiten vermehren [31]. Tachyzoiten invadieren Zellen, durch die schnelle intrazelluläre Replikation kommt es zum Tod der Zielzelle und Tachyzoiten verbreiten sich im gesamten Wirtsorganismus. Sie gelangen ins Gehirn, Retina, Skelett- und quergestreifte Muskulatur, wo Tachyzoiten unter dem Druck des Immunsystems in Bradyzoiten umgewandelt werden, die Zysten ausbilden, in denen der Erreger lebenslang (latente Infektion) überdauert [30].



**Abb. 1: *T. gondii* Lebenszyklus [32]**

Menschen stecken sich durch den Verzehr von rohem oder unzureichend erhitztem Fleisch (Zysten), mit Katzenkot kontaminierter Erde oder Wasser (Oozysten), seltener durch konnatale Übertragung oder Transplantationen und Blutprodukte an [33].

### 1.2.2 Humanmedizinische Bedeutung von *T. gondii*

Mehr als 30% der Menschheit sind mit *T. gondii* infiziert. Die Infektion von immunkompetenten Individuen verläuft meistens asymptomatisch und mündet in einer latenten Infektion mit Gewebezysten. Die latente Infektion kann bei Immunsuprimierten (AIDS- oder Transplantationspatienten) zu einer Reaktivierungstoxoplasmose führen, die sich zumeist als Enzephalitis manifestiert. [33-35]

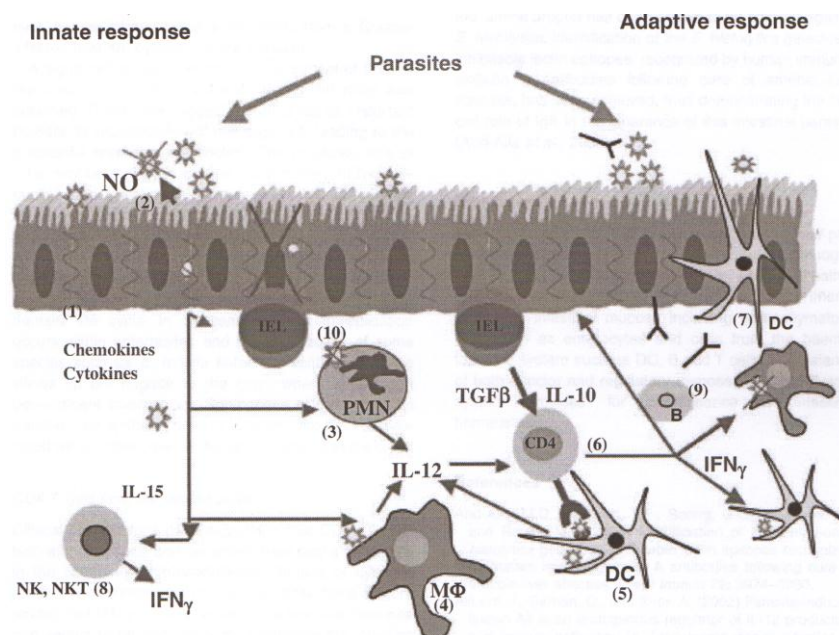


### 1.2.3 Immunantwort gegen *T. gondii*

Die Ausprägung der Infektion des Menschen scheint durch den immunologischen Status, den Parasitenstamm, das Geschlecht und die aufgenommene Menge des Parasiten beeinflusst zu sein [33].

Die Infektion von *Toxoplasma gondii* führt zu einer starken lokalen und systemischen Th1-Antwort, die durch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-12 (IL-12), Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , gekennzeichnet ist [33].

Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Immunantwort der Mukosa.



**Abb. 2 Mukosale Immunantwort gegen *T. gondii* [36]**

Interessanterweise scheinen die gleichen Zellen und Immunmechanismen, die die protektive Immunantwort vermitteln, auch an der überschießenden Immunantwort beteiligt zu sein, die bei suszeptiblen Mäusen in einer tödlichen Pan-Enteritis (Immunpathologie) resultiert [36-41].

### 1.2.4 Mausmodelle der Toxoplasmose

Die Ausprägung der Infektion der Maus hängt wie die Ausprägung der human Infektion vom immunologischen Status, dem Parasitenstamm, dem Geschlecht und der aufgenommenen Parasitenzahl ab [33, 41]. Während die Niedrigdosis-Infektion (10 Gewebezysten) in der Maus den (meist asymptomatischen latenten) Verlauf der Infektion beim immungesunden Menschen widerspiegelt, verläuft die Hochdosis-Infektion (100 Gewebezysten) in der C57BL/6 Maus als Immunpathologie mit Entwicklung einer letalen Pan-Itis [40, 41].

#### 1.2.4.1 Protektive Immunantwort nach Infektion der Maus mit 10 Zysten

Nach der oralen Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* entwickelt sich eine protektive Th1-Immunantwort. Der Erreger disseminiert wie bei der Infektion des Menschen im gesamten Organismus, um in ZNS und quergestreifter Muskulatur in Zystenform lebenslang zu überleben [30]. Die Immunmechanismen, die zur Kontrolle der Parasitenreplikation führen, sind durch Aktivierung des zellulären und humoralen Arms des Immunsystems charakterisiert. Es erfolgt eine initiale lokale (intestinale) Immunantwort, gefolgt von einer systemischen Immunantwort. Antigenpräsentierende Zellen, v. a. dendritische Zellen sezernieren Zytokine wie IL-12, die insbesondere CD4<sup>+</sup>-Zellen zur verstärkten Produktion von IFN- $\gamma$  aktivieren [40]. IFN- $\gamma$  ist ein essentieller Mediator der protektiven Immunantwort durch Aktivierung von Makrophagen, die im Zusammenspiel mit der direkten Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup>-Zellen die ungebremste Vermehrung des Parasiten verhindern [33, 42]. Neben Epithelzellen sind im Darm intraepitheliale- und Lamina propria-Lymphozyten am Aufbau der lokalen protektiven Immunantwort beteiligt [14, 33, 39, 40, 43].

Granulozyten sind phagozytierende Zellen, die im Körper zirkulieren und in der Frühphase von Infektionen an den Ort der Infektion rekrutiert werden [41, 44]. Granulozyten,

Makrophagen und Monozyten zeichnen sich durch eine große Heterogenität aus [44]. Der Darm ist eine der reichsten Quellen von Makrophagen im Körper [44]. Im Rahmen der Infektion mit *T. gondii* sind zum einem Granulozyten für die primäre Immunantwort gegen den Parasiten wichtig, während in der späteren Infektionsphase andere Zellen der adaptativen Immunantwort entscheidend essentiell sind [41, 45]. Neue Studien zeigen, dass neben Granulozyten auch Monozyten, insbesondere inflammatorische Monozyten, die sich durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker von herkömmlichen Monozyten unterscheiden, eine kritische Rolle bei der Infektion spielen [41, 44, 46, 47].

#### **1.2.4.2 Th1-Typ Immunpathologie nach oraler Infektion mit 100 Zysten**

Im Gegensatz zum Verlauf der oralen Infektion mit 10 Zysten kommt es nach oraler Infektion mit 100 Zysten bei suszeptiblen C57BL/6-Tieren (H2<sub>b</sub>-Haplotyp) zu einer überschießenden Th1-Immunantwort, die unter dem Bild einer Pan-Ileitis innerhalb von 7-13 Tagen zum Tode führt [37, 39]. Die lokale Immunantwort ist durch die Produktion von IL-12, IL-18 und IL-23 sowie von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und iNOS gekennzeichnet; alle genannten Immunmediatoren sind an der Entwicklung der Pathologie beteiligt [37, 39, 48, 49]. Im Gegensatz dazu sind IL-10 [50] und TGF- $\beta$  [36] an der Hemmung der pro-inflammatorischen Mediatoren beteiligt; ihre Produktion im Rahmen der Infektion mit 100 Zysten verhindert aber nicht die Entstehung der Pathologie [14, 37]. Die Faktoren, die zur überschießenden Immunantwort führen, sind nicht bekannt. Die Replikation des Parasiten im Darm ist ab dem 5. Tag nach der Infektion immunhistologisch nachweisbar und mit der Entstehung der Pathologie assoziiert, ohne dass die Parasitenzahl die Ausprägung der Pathologie bestimmt; so sind Mäuse ohne T-Zellen resistent gegen die Entwicklung der Pathologie, obwohl sie erhöhte Parasitenzahlen im Gegensatz zu Kontrollmäusen aufweisen [37, 39]. Im Gegensatz zur Infektion mit 10 Zysten kommt es bei der Infektion mit 100 Zysten zu einer massiven Veränderung der Darmflora, die

durch Verlust der bakteriellen Diversität und um eine vielfache höhere Bakterienlast im Ileum gekennzeichnet ist [51]. Außerdem kommt es bei der Infektion mit 100, nicht aber mit 10 Zysten, zu einer deutlichen Sekretion von IL-22; IL-22-defiziente Mäuse entwickeln keine Immunpathologie, weisen aber gleiche Parasitenzahlen wie Kontrollmäuse auf [48].

IL-23 spielt eine zentrale Rolle in der Induktion der Ileitis durch *T. gondii* [48, 52]. Studien von Autoimmunkrankheiten zeigen eine deletäre Rolle von IL-23 durch die Generierung von IL-17-produzierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen, sog. Th-17-Zellen [48]. Außerdem wurde eine erhöhte IL-17-Expression in der Mucosa von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen [48, 53-55]. Dabei produzieren in diesen Patienten und experimentellen Kolitis-Modellen intestinale Th17-Zellen, zumeist CD4<sup>+</sup>-Zellen [48], IL-22 [56], interessanterweise wird IL-22 bei experimentellen Modellen von Kolitis eine protektive Rolle zugesprochen [57-60].

Abb. 3 zeigt schematisch die überschießende Th1-Immunantwort nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*.

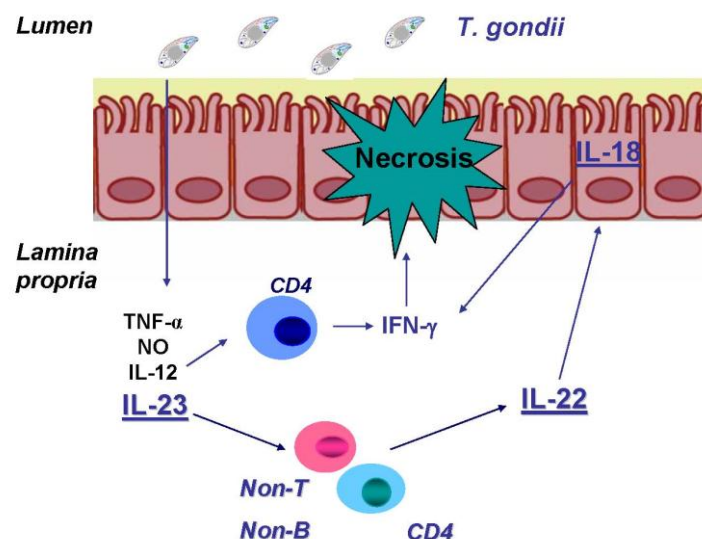


Abb. 3: Überschießende Th1-Immunantwort gegen *T. gondii* [41]

### 1.3 Fragestellung

Da die Expression von Klf4 in phagozytierenden und antigen-präsentierenden Zellen einen Einfluss auf die Regulation der T-Helfer-Zell Antwort hat, ist die Untersuchung der Rolle von Klf4 bei der Abwehr von Infektionen und überschießenden Immunantworten von großem Interesse. Da derzeit nur wenige Informationen zum Einfluss von Klf4 auf Immunantworten gegen Infektionserreger vorliegen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von Klf4 in der Generierung von protektiven und pathologischen Immunantworten gegen die orale Infektion mit *T. gondii* in der Maus untersucht. Insbesondere soll untersucht werden, ob Klf4 einen Einfluss auf die Produktion der Schlüssel-Zytokine IFN- $\gamma$  (für Th-1-Antworten) und IL-17 (für Th-17- Antworten) hat.

Im Detail wurden die folgenden Fragen bearbeitet:

1. Spielt Klf4 eine Rolle bei der Th-1 Immunantwort der Maus gegen *T. gondii*?
2. Spielt Klf4 eine Rolle bei der Th-17 Immunantwort der Maus gegen *T. gondii*?
3. Welche Bedeutung hat Klf4 für die Reifung spezifischer Zellpopulation nach oraler Infektion mit *T. gondii*?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Mäuse

Es wurden 8-20 Wochen alte Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet, die in den Tierställen der Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin (FEM) der Charité unter spezifisch keimfreien Bedingungen gehalten wurden. Die Tiere hatten sterilisiertes Trockenfutter sowie eine Wasserflasche ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden vor der Infektion und ab Tag 7 post infectionem alle zwei Tage gewogen.

LoxP-flanked Mäuse wurden, wie von Katz et al. Beschrieben, generiert [61] und freundlicherweise von K. H. Kästner, University of Pennsylvania, USA, zur Verfügung gestellt. VAV-CRE Mäuse [62, 63] wurden von A. Roberts (WEHI, Victoria, Australia) zur Verfügung gestellt und mit *Klf4<sup>fl/fl</sup>*Mäusen verpaart, um *Klf4<sup>fl/fl</sup>VavCre* Mäuse zu generieren.

Eine Genehmigung zur Durchführung der Versuchsvorhaben lag vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin vor.

<b>Stamm</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>Herkunft</b>
<i>Klf4<sup>+/+</sup></i>	C57BL/6	Zucht des FEM Charité
<i>Klf4<sup>-/-</sup></i>	C57BL/6	Zucht des FEM Charité
IL-23p19 <sup>-/-</sup>	C57BL/6	Nico Ghilardi, Molecular Biology Department, Genentech, South San Francisco, USA
NMRI		Zucht des FEM Charité

Interferon-Regulatory-Factor-8 <sup>-/-</sup> ( <i>Irf8</i> <sup>-/-</sup> ) (vormals ICSBP <sup>-/-</sup> )	C57BL/6	Zucht des FEM Charité
---	---------	-----------------------

### 2.1.2 *Toxoplasma gondii*

Alle Infektionsexperimente wurden mit dem Stamm ME49 (Prof. J. Remington, Stanford University, USA), zystenbildend und maus-avirulent (Typ-II-Stamm), durchgeführt.

### 2.1.3 ELISA- und andere Kits

Kit	Hersteller
BD OptEIA™ Set Mouse IFN $\gamma$	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD OptEIA™ Set Mouse IL-6	BD Biosciences
LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche, Mannheim, Deutschland
peqGOLD MicroSpin Total RNA	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Quantikine® Mouse IL-17 Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Quantikine® Mouse/Rat IL-22 Immunoassay	R&D Systems
SuperScript™ III Platinum One Step quantitative PCR System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.4 Primer und Proben

Primer <sup>a</sup>	Orientierung	Sequenz 5'-3' <sup>b</sup>
TOX-9	Sense	AggAgAgATATCAggACTgTAg
TOX-10as	Antisense	gCgTCgTCTCgTCTAgATCg
Sonde FL	Sense	gAgTCggAgAgggAgAAgATgTT-FL
Sonde LC	Sense	LC-CCggCTTggCTgCTTTTCCTg-PH
IFNg <sub>s</sub>	Sense	CATCAgCAACAACATAAgCgTCA
IFNg <sub>as</sub>	Antisense	CTCTTCCCCACCCCgAATCA
Sonde_FL	Sense	TgCCAAgTTTgAggTCAACAACCCACA-FL
Sonde_LC	Sense	LC-TCCA <sub>g</sub> CgCCAAgCATTCAATgAgC-PH
HPRT <sub>s</sub>	Sense	gTTggATACaggCCA <sub>g</sub> ACTTTgT
HPRT <sub>as</sub>	Antisense	CACA <sub>g</sub> ACTAgAACACCTgC
Sonde_FL	Sense	AAAgCCTAAgATgAgCgCAA <sub>g</sub> TTgA-FL
Sonde_LC	Sense	LC-TCTgCAAATACgAggAgTCCTgTTg-PH

<sup>a</sup>Alle Primer wurde für die Benutzung im LightCycler<sup>®</sup> durch TIB Molbiol, Berlin, Deutschland hergestellt.

<sup>b</sup>Alle cDNA-Sequenzen wurden von der GenBank Datenbank bezogen.

### 2.1.5 Enzyme und Antikörper

Produkt	Hersteller
Anti-Maus-CD11b	BD Pharmingen
Anti-Maus-CD11c	BD Pharmingen
Anti-Maus-CD3e	BD Pharmingen



Anti-Maus-CD4	BD Pharmingen
Anti-Maus-CD45R/B220	BD Pharmingen
Anti-Maus-CD8a	BD Pharmingen
Anti-Maus-IFN $\gamma$	BD Pharmingen
Anti-Maus-IL-17A	BD Pharmingen
Anti-Maus-Ly6C	BD Pharmingen
Anti-Maus-Ly6G	BD Pharmingen
Streptavidin-PerCP	BioLegend, Uithoorn, Holland

### 2.1.6 Chemikalien

Substanz	Hersteller
2- Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampuwa <sup>®</sup> Spüllösung, Plastipur <sup>®</sup>	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Aqua dest.	Institut für Mikrobiologie und Hygiene
BD GolgiStop <sup>™</sup>	BD Biosciences
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloralhydrat	Merck
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Eisessig	Merck
Enthellan <sup>®</sup> Neu	Merck

Eosin	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd 37%	Merck
Hämatoxylin	Merck
Ionomycin	Sigma
Isofluran, Forene <sup>®</sup>	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kupfersulfat (CuCO <sub>4</sub> )	Merck
MgSO <sub>4</sub>	Invitrogen
Naphthyl-Ethylendiamin	Sigma
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma
Natriumcarbonat wasserfrei (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumjodat	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PAP, Rabbit, Polyclonal	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA)	Sigma
Phosphate buffered saline (Dulbecco`s PBS 1x ohne Ca & Mg)	PAA, Cölbe, Deutschland

Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth
Saponin	Sigma
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 37%	Merck
Stickstoff, flüssig	Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Sulfanilamid	Sigma
TMB (3,3,5,5-Tetramethylbenzidindihydrochlorid)	Sigma
Tris-HCl	Bio-Rad, München, Deutschland
Trypanblau	Biochrom AG
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich
Wasser, RNase-frei (DEPC)	0,1% Diethylpyrocarbonat in Aqua dest. Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30% Lsg. in Wasser	Merck
Xylol reinst	Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, USA
Zitronensäure (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Sigma

### 2.1.7 Nährmedien und Seren

Name	Hersteller
DMEM 1x	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
Bovines Serum-Albumin 5% (BSA)	Invitrogen
Ratten-Serum	Institut für Mikrobiologie und Hygiene

RPMI 1640 + GlutaMAX™	Invitrogen
Schweineserum	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

#### ELISA Coating-Puffer

IFN $\gamma$  und IL-6: 0,1 M Sodium Carbonate (8,4g NaHCO<sub>3</sub> + 3,56g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), pH 9,5

#### ELISA Blocking-Puffer

10% FCS in PBS

#### ELISA Substrat-Puffer

0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,1M Zitronensäure

in Aqua dest.

#### ELISA Waschpuffer

0,05% Tween 20 in PBS

#### ELISA TMB-Substrat-Lösung

Eine TMB-Tablette in 10 ml Substratpuffer lösen, kurz vor dem Auftragen 2,5  $\mu$ L 30%iges.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben.

#### ELISA Stopplösung

1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Aqua dest. gelöst

Eosin-Lösung

1g Eosin

3 Tropfen Eisessig

ad 100 ml Aqua dest.

Hämatoxylin-Lösung

Hämatoxylin

Natriumjodat

Kalialaun

FACS Fix-3,7% Formaldehydlösung

Formaldehyd-Stammlösung (37%ig) 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

FACS Wash

Extrazelluläre Färbung - 5% FCS in PBS

Intrazelluläre Färbung – 0,5% Saponin in PBS

FACS Flow

BD Biosciences, Heidelberg

Erythrozyten-Lyse Puffer

1. Zellpellet in 500 µL sterilem Aqua dest. aufnehmen (nicht länger als 45 Sek)
2. 1 ml 1,8% NaCl-Lösung dazu geben
3. 5 ml DMEN dazu geben und zentrifugieren

Inkubations-Lösung für intrazelluläres FACS

10% FCS, 1% P/S in RPM Medium

Master Mix für FACS Färbung

Extrazelluläre Färbung (pro Probe) - 95µL 5% FCS + 5µL Ratten- bzw. Hamster-Serum +  
1µL Antikörper

Intrazelluläre Färbung (pro Probe) - 95µL 0,5% Saponin + 5µL Ratten- bzw. Hamster-Serum  
+ 1µL Antikörper

Trypanblau 0,5%

Trypanblau 0,5% in physiologischer Kochsalzlösung

Für PAP Färbung:

PBS-Stammlösung (25-fach)

150,4g       $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$

26g          $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

800 ml      Aqua dest.

PBS-Gebrauchslösung

40 ml        PBS-25x- Stammlösung

960 ml      Aqua dest.

Schweineserum

1800 µL     PBS-Gebrauchslösung

200 µL      Schweineserum

Primärantikörper

1999 µL      PBS-Gebrauchslösung

1 µL          Primärantikörper

Sekundärantikörper

1980 µL      PBS-Gebrauchslösung

20 µL        Sekundärantikörper

PAP-Complex

1980 µL      PBS-Gebrauchslösung

20 µL        PAP, Rabbit, polyclonal

DAB-Lösung

1 DAB-Tablette in 5 ml Aqua dest. lösen, abgedunkelt lagern

DAB-Arbeitslösung

5 ml DAB-Lösung + 5 µL 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Lösung

20 ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 180 ml Aqua dest.

0,5% CuCo<sub>4</sub>-Lösung

0,5 g        CuCo<sub>4</sub>

100 ml      Aqua dest

1% Ammoniak-Lösung

1 ml Ammoniak

100 ml Aqua dest.

Für PCR:

RLT-Puffer Plus

1 ml QVL-Puffer + 20 µL β-Mercaptoethanol

Lysis-Puffer für DNA-Isolierung

100 mM Tris-Hcl pH 8-8,5 + 5 mM EDTA pH 8 + 0,2% SDS + 200 mM NaCl + Proteinase K

Für Griess-Reaktion:

Griess-Lösung

1% Sulfanilamid + 0,1% Naphthyl-Ethylendiamin + 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Griess-Standard

1M NaNO<sub>2</sub> Stocklösung in DMEN

Organkulturlösung

DMEM-Medium + 1% P/S

**2.1.9 Geräte und Materialien**

Name	Hersteller
Brutschrank	Heraeus-Holding, Hanau, Deutschland



Deckglas	Menzel-Glaser, Braunschweig, Deutschland
Digitalkamera für Mikroskop	Inteq GmbH, Berlin, Deutschland
Elektronische Analysewaage 1702 MP8	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
FACS Calibur	BD Biosciences
Gefrierschrank -20°C Premium	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -86°C VIP Series	Sanyo Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan
Knopfkanüle	Carl Roth
Kühlplatte	Microm-International-GmbH, Walldorf, Deutschland
LightCycler®	Roche
Mikroskop Axiostar 1031-031	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Oberkochen, Deutschland
Mikrotomklingen (Mikrotome Blade N35)	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Mörser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf
Neubauer Zählkammer Assistent	Karl Hecht AG, Sondheim, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf
Pipetten verschiedener Größen	Eppendorf
Pipettenspitzen verschiedener Größen	Eppendorf
Pistill	VWR
Plattenphotometer (Tecan Spectra II)	Crailsheim, Deutschland

Präparierbesteck	Aesculap AG Et Co. KG/Braun,Tuttlingen, Deutschland
Rotationsmikrotom (HM355)	Microm, Neuss, Deutschland
Rotor Stator (Micra RT)	Carl Roth
Sterile Arbeitsbank LaminAir <sup>®</sup>	Heraus-Holding GmbH,
Thermocycler Gene Amp <sup>®</sup> PCR System 2700 und ABI PRISM <sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf AG
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwalbach, Deutschland
Zentrifuge, groß (Megafuge 1.0)	Heraeus

### 2.1.10 Plastikware

Name	Hersteller
30G-Kanüle	BD Biosciences
Gewebe-Einbettkassetten Uni-Safe <sup>®</sup>	Medis-Weber Co., Buseck, Deutschland
Nunc-Immuno Module (Mikrotiterplatte für ELISA)	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
Parafilm <sup>®</sup> M	Pechiney Plastic Packaging Inc., Chicago, USA
Pipettenspitzen verschiedener Größen	Eppendorf
Reagiergefäß 1,5 ml und 2ml SafeSeal	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

Röhrchen 15 ml und 50 ml Falcon	BD Biosciences
Rundbodenröhrchen 5 ml Falcon (FACS Tubes)	BD Biosciences
Serologische Pipetten versch. Größen	BD Biosciences
Spritze mit Kanüle 1 ml	BD Biosciences
Spritze 10 ml	BD Biosciences
Zellkultur Platte	SARSTEDT
Zellsieb 70 µm Falcon	BD Biosciences

### 2.1.11 Software und Datenbanken

Name	Hersteller
Serion Evaluate	Median Software + Konzepte GmbH, Bonn, Deutschland
Cellquest	BD Biosciences
LightCycler Data Analysis Software 3.5	Roche
GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Orale Infektion mit *T. gondii*

Die orale Infektion der Mäuse erfolgte mit 10 bzw. 100 Zysten *T. gondii*, die aus Gehirnen von infizierten NMRI-Mäusen gewonnen wurden. NMRI-Mäuse waren 2-3 Monate vorher mit 10 Zysten intraperitoneal infiziert worden. Nach Tötung durch Isofluran-Betäubung

wurde das Gehirn entnommen und in 1 ml PBS mit Mörser und Pistill zerrieben, in ein 15 ml Röhrchen überführt und nach Homogenisierung durch eine 30G-Kanüle auf Eis gelagert. Die Anzahl der Zysten wurde in 20  $\mu$ L Gehirnsuspension unter dem Mikroskop bestimmt. Die Suspension wurde für die erforderliche Zystenkonzentration mit PBS verdünnt und den Mäusen in einem Volumen von jeweils 0,2 ml mit Hilfe einer gebogenen Knopfkanüle oral verabreicht.

### **2.2.2 Tötung der Tiere und Organentnahme**

Die Mäuse wurden am 7. oder 9. Tag nach der Infektion durch Isofluran-Inhalation in tiefe Narkose versetzt. Anschließend wurde Blut mittels Herzpunktion gewonnen, Serum durch Zentrifugation gewonnen, in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Anschließend wurde das Peritoneum mit einer sterilen Schere eröffnet. Ein Viertel der Milz und ungefähr 0,25 cm<sup>2</sup> distaler Dünndarm wurden für die Organkultur in jeweils eine mit 400  $\mu$ L/Well DMEM-Medium + 1% P/S gefüllte 24 Well-Platte überführt und auf Eis gelagert. Der rechte Leberlappen, ein Drittel der Milz sowie die rechte Lunge und 10 cm des restlichen Dünndarmes wurden zur späteren (immun-)histologischen Weiterverarbeitung in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Der Darmabschnitt wurde dazu mit dem proximalen Ende nach außen in der Histologiekassette zu einer „Schweizer Rolle“ aufgerollt. Ein Drittel der Milz und eine Hälfte der mesenterialen Lymphknoten (MLN) wurden für die Durchflusszytometrie in 500  $\mu$ L/Well PBS überführt und auf Eis gelagert. Das letzte Drittel der Milz und ungefähr 0,25 cm<sup>2</sup> distaler Dünndarm wurden für spätere Aufarbeitung in der PCR in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

### 2.2.3 Histologische Methoden

Die Organe wurden nach Entfernung des Formaldehyds im Institut für Pathologie der Charité am CBF in Paraffin eingebettet. Am Mikrotom wurden 0,5 µm dünne Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgenommen und über Nacht bei 56 °C fixiert. Die Schnitte wurden daraufhin mit Hämatoxylin/Eosin bzw. mit der Immunperoxidase-Färbung gefärbt.

#### 2.2.3.1 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

Die Objektträger wurden in Glasküvetten in folgende Lösungen getaucht:

- Entparaffinieren und Entwässern der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe:

je 5 Min.

- 2 x Xylol

bis keine Schlieren mehr zu sehen sind

{ 100%iges Isopropanol  
96%iges Ethanol  
80%iges Ethanol  
70%iges Ethanol

Spülen in Aqua dest.

5 Min.

- Hämalaun nach Mayer

Spülen in Aqua dest.

5 Min.

- Spülen und Bläuen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser

30 Sec. bis 1 Min.

- Eosin (Inkubationszeit je nach Frische des Eosins)

Spülen in Aqua dest

- Rehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

bis keine Schlieren mehr zu sehen sind

{	70%iges Isopropanol
{	80%iges Ethanol
{	96%iges Ethanol
{	100%iges Ethanol

je 5 Min.                                    - 2 x Xylol

Danach wurden die histologischen Schnitte mit Entellan eingedeckt.

### 2.2.3.2 Immunhistochemische Detektion von *T. gondii*

Die immunhistochemische Detektion von *T. gondii* wurde mittels einer polyklonalen Immunperoxidase-Färbung durchgeführt. Es wurde immer ein positiver Kontrollschnitt (Darmrolle einer mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten C57BL/6-Maus) mitgeführt. Antikörper, Serum und Reagenzien wurden in PBS-Gebrauchslösung verdünnt. Die Paraffinschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und entwässert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität im Gewebe wurden die Schnitte in einer Küvette in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS Lösung für 20 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mehrfach mit Aqua dest. gewaschen und 2x mit PBS gespült. Die Schnitte wurden aus der Spüllösung genommen, vorsichtig um den Schnitt herum abgewischt und mit 100 µL Schweineserum bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei Raumtemperatur wurde das Serum abgekippt und 100 µL pro Schnitt des polyklonalen Primärantikörpers gegen *T. gondii* (Hyperimmunserum eines mit *T. gondii* infizierten Kaninchens [49]) mit einer Pipette auf die Schnitte aufgetragen. Die Schnitte inkubierten über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am folgenden Tag wurden die Schnitte 2x für 5 Min. mit PBS abgespült und sodann 100 µL pro Schnitt des biotinyliertes Sekundärantikörpers (Schwein-Anti-Kaninchen) mit der Pipette aufgetragen. Danach wurden die Schnitte für 30 Min. abgedeckt bei RT inkubiert. Nach

einem Spülschritt (2x für 5 Min. mit PBS) wurden je 100 µL des Peroxisase-anti-Peroxidase-Komplexes aufgetragen und für 30 Min. bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 2x für 5 Min. in PBS gespült, sodann wurden je 4-5 Tropfen der DAB-Arbeitslösung mit einer 5 ml-Spritze und Rundfilter auf die Schnitte aufgebracht und für 5 Min. inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle des Färbeergebnisses (nach spätestens 5 Min.) wurden die Schnitte für 5 Min. in PBS abgewaschen und 2x in Aqua dest. gespült, bevor sie in einer Küvette für 5-7 Min. in einer 0,5% CuSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert wurden, um die Färbung zu verstärken. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden sie mit Hämatoxylin gegengefärbt und wie folgt weiterverarbeitet:

5 Sec. - Hämatoxylin

2 x spülen in Aqua dest

15 Sec. - 1%ige Amoniaklösung

2 x spülen in Aqua dest.

bis keine Schlieren mehr zu sehen sind

{	70%iges Isopropanol
	80%iges Ethanol
	96%iges Ethanol
	100%iges Ethanol

je 5 Min. - 2 x Xylol

Danach wurden die histologischen Schnitte mit Entellan eingedeckt.

### 2.2.3.3 Auswertungen der histologischen Schnitte und Dokumentation

In den H&E-gefärbten Schnitten des Darms wurde bei 200-facher Vergrößerung das Vorhandensein bzw. die Schwere der pathologischen Veränderungen mittels eines standardisierten Scoring-Verfahrens [51] beurteilt:

<b>Histologische Kriterien</b>	<b>Score</b>
1. Normalbefund: Lamina propria liegt direkt an Epithel an, kein Ödem, Zotten intakt 2. Darminhalt aus fibrillären Komponenten, keine Zellen, kein Transsudat	0
1. Ödematöse Schwellung zwischen Lamina propria und Epithel, Zotten intakt 2. Keine Zellen im Darmlumen, kein Transsudat	1
1. Transsudat im Darmlumen, aber Zotten intakt 2. Darminhalt vorwiegend flüssig, kaum oder keine Zellen	2
Wie 2, aber Darminhalt aus Transsudat und vorwiegend zellulärem Material (v. a. abgeschilferte Epithelzellen)	3
Wie 3, massenhaft zelluläres Material im Lumen, dazu beginnende Nekrosen (v. a. die Spitzen der Zotten betreffende Nekrosen)	4
Nekrosen deutlich ausgeprägt, v. a. distal, makroskopisch rot-violett gefärbtes Darmlumen, Nekrosen jedoch nicht über das gesamte Ileum verbreitet	5
Komplette Nekrose des Ileums, auch proximal	6

**Tab. 3: Histologische Kriterien der Schwere der pathologischen Veränderungen im Darm**

Die inflammatorischen Areale in H&E-gefärbten Schnitten der Leber wurden in 100-facher Vergrößerung pro Gesichtsfeld gezählt.

Nach Immunperoxidase-Färbung wurden die *T. gondii*-Vakuolen jeweils in einem zufällig ausgewählten 1 cm langen Abschnitt distal in 200-facher Vergrößerung gezählt.



Repräsentative Ausschnitte der histologischen Schnitte wurden bei der jeweiligen Vergrößerung digital fotografiert.

#### **2.2.4 Gewinnung von Serum**

Zum Nachweis von Zytokinen im Blut wurde Serum gewonnen. Dafür wurde Vollblut aus dem Herzen entnommen und über Nacht bei 4°C gelagert. Schließlich wurde es bei 8500 rpm für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand bei -80°C tiefgefroren.

#### **2.2.5 Organkultur**

Um die Zytokinsekretion in Ileum und Milz zu bestimmen, wurden die Organe als Organkultur über Nacht in 400 µL serumfreien DMEM/0,5% P/S bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde entnommen und bis zur weiteren Verwendung im Zytokin-ELISA bei -80°C tiefgefroren.

#### **2.2.6 ELISA zum Nachweis von Zytokinen und Stickoxid in Serum und Organkulturen**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17 und IL-22 in Serum und Organkulturüberständen nach 24-stündiger Inkubation wurden ELISA-Kits nach den Anweisungen der Hersteller verwendet. Serum und Überstände wurden unverdünnt verwendet.

### **2.2.6.1 IL-6 und IFN- $\gamma$ ELISA**

Mikrotiterplatten (96 Wells) wurden mit je 50  $\mu\text{L}$  des entsprechenden Antikörpers beschichtet (Coating) und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Platten mit Waschpuffer (siehe 2.1.7) 5x gespült, mit 100  $\mu\text{L}$ /Well Blockingpuffer beschickt und 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Platten wurden 50  $\mu\text{L}$ /Well der Proben und der Standards (1:2 Verdünnungsreihe mit 7 Verdünnungsstufen) sowie ein Leerwert aufgetragen und 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde der biotinylierte Sekundärantikörper gemeinsam mit der Streptavidin-Peroxidase-Lösung zu je 50  $\mu\text{L}$ /well aufgetragen und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Daraufhin wurde siebenmal gewaschen, 50  $\mu\text{L}$ /well der TMB-Lösung aufgetragen und für maximal 30 Min. abgedunkelt bei RT inkubiert. Die entstehende Farbreaktion wurde mit 25  $\mu\text{L}$ /Well 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt und die optische Dichte mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### **2.2.6.2 IL-17 und IL-22 ELISA**

Mikrotiterplatten (96 Wells) wurden mit je 50 bzw. 100  $\mu\text{L}$  des entsprechenden Verdünnungspuffers beschichtet (Coating) und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurden 50  $\mu\text{L}$ /well der Proben und der Standards (1:2 Verdünnungsreihe mit 7 Verdünnungsstufen) sowie ein Leerwert aufgetragen und gemischt, wonach 2 Stunden bei RT inkubiert wurden. Nach fünfmaligem Waschen der Platten wurden 100  $\mu\text{L}$ /well IL-17- bzw. 200  $\mu\text{L}$ /well IL-22-Konjugat aufgetragen und 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde je 100  $\mu\text{L}$ /well Substrat-Lösung aufgetragen und für 30 Min. abgedunkelt bei RT inkubiert. Die entstehende Farbreaktion wurde mit 25  $\mu\text{L}$ /well Stop-Lösung gestoppt und

die optische Dichte mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### **2.2.7 Bestimmung der Stickoxid (NO)-Konzentration**

Die Griess-Reaktion wurde zur Bestimmung der NO-Konzentration verwendet. Zuerst wurde die Stocklösung des Standards 1:2 (1 mM Endkonzentration) verdünnt. Danach wurden 50 µL/well der Proben und des Standards (1:2 Verdünnungsreihe mit 8 Verdünnungsstufen) auf die Mikrotiterplatten (96 Wells) aufgetragen. Anschließend wurden 100 µL/well Griess-Lösung aufgetragen und die optische Dichte mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

### **2.2.8 Gewinnung von mononukleären Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten**

Intrazelluläre Zytokine und die Frequenzen von Zellpopulationen in der Milz- und den MLN wurden in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Organe wurden in ein 70 µm-Zellsieb überführt, mit einer Schere und einem Spritzenstempel zerkleinert und mit 10 ml PBS + 5% FKS gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 1400 rpm für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde eine Erythrozyten-Lyse der Milz-Zellen durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 1 ml PBS + 5% FKS resuspendiert. Die Zahl lebender Zellen wurde durch Ausschlußfärbung mit Trypanblau (Verdünnung in Medium: 1:20) in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### **2.2.9 Durchflusszytometrie**

Es wurde eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Färbung eingesetzt. Oberflächen- und

intrazelluläre Färbung wurden zusammen durchgeführt. Die einzelnen Proben wurden mit 100  $\mu\text{L}$  FACS-Wash versetzt und bei 400 g für 10 Min. zentrifugiert. Für die Detektion intrazellulärer Zytokine wurde eine Restimulation der Zellen mit 50  $\text{ng ml}^{-1}$  PMA, 750  $\text{ng ml}^{-1}$  Ionomycin in RPMI / 10% FKS / 1% Pen-Strep und GolgiStop für 6 Stunden bei 37° C im Brutschrank durchgeführt. Daraufhin wurden die Zellen 2x mit jeweils 1 ml PBS + 5% FKS gewaschen und schließlich mit 500  $\mu\text{L}$  FACS Fix 20 Min. bei 4° C ohne Lichteinfluss inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und über Nacht bei 4° C gelagert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in FACS-Wash / 0,5% Saponin zur Perforation der Zellwände aufgenommen. Nach einem Blockierungsschritt mit Ratten- bzw. Hamster-Serum erfolgte die intrazelluläre Färbung mit Anti-Zytokin-Antikörpern bei 4° C für 30 Min.. Entsprechende Isotypkontrollen wurden für alle Färbungen in gleicher Weise mitgeführt. Die Zellen wurden 1x gewaschen und in den FACS-Tubes gelagert. Sämtliche Verdünnungen wurden in FACS-Wash vorgenommen.

### **2.2.10 PCR**

#### **2.2.10.1 Isolierung von DNA**

Distales Ileum wurde mittels eines Schüttel-Hitzeblocks in 500  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer (siehe 2.1.7) bei 56° C geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 12.000 rpm für 20 Min. wurde der DNA-haltige Überstand aufgefangen und die DNA mit 400  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt. Die präzipitierte DNA wurde entnommen und mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet (über Nacht oder im Eksikkator). Danach wurden die DNA in 200-500  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O (DEPC) gelöst und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

### 2.2.10.2 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA wurde das peqGOLD MicroSpin Total-Kit benutzt. 0.25 cm<sup>2</sup> des Ileums wurde mit 400 µL QVL Puffer + 1% 2-Mercaptoethanol versetzt, im Rotor-Stator homogenisiert und anschließend 2 Min. bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß pipettiert (350 µL) und mit der gleichen Menge Ethanol (70%) gemischt. Die HiBind<sup>®</sup>-MicroSpin-Säule wurde in ein 2 ml Sammelgefäß platziert und 700 µL auf die Säule gegeben, um die RNA an die mit Silicagel beschichtete Säule zu binden. Danach wurde für 15 Sek. bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. In einem ersten Schritt wurde dann Waschpuffer I auf die Säule gegeben und für 1 Min. bei 12.000 rpm zentrifugiert; im zweiten und dritten Schritt wurde Waschpuffer II für 30 Sek. aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen auf neue 2 ml Sammelröhrchen gegeben und für 2 Min. bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Die Probensäulen wurden dann in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 25 µL RNase-freiem Wasser überführt. Nach 1 Min. wurde für 1 Min. bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und die RNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm gegen 280 nm bestimmt.

### 2.2.10.3 Quantifizierung der *T. gondii*-DNA

Zur Quantifizierung der *T. gondii*-DNA wurde der LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes-Kit verwendet. 250 ng der Template-DNA wurden mit 2 µl Enzymmix, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM jedes Oligonukleotid-Primers und 0.2 µM Oligonukleotid zu einem Endvolumen von 10 µl in Light Cycler-Plastikkapillaren zusammengefügt. Die PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 10 Min. 95°C zur Initialen Denaturierung, 50 Zyklen 95°C für 10 s, 52°C für 20 s und 72°C für 30 s. Zum Abschluss erfolgte ein Zyklus bei 40°C für 30 s mit einem einzelnen Aufnahmezeitpunkt der Fluoreszenz am Ende. Als negative

Kontrolle wurde A. dest. benutzt. Mit jedem Lauf wurde parallel eine Standardkurve der Fluoreszenz von einer Verdünnungsreihe von 2,5 bis 250 pg *T. gondii*-DNA erstellt. Die Fluoreszenz wurde mittels LightCycler Data Analysis Software 3.5 berechnet.

#### **2.2.10.4 Quantifizierung von IFN- $\gamma$**

RNA wurde mit dem SuperScript<sup>TM</sup> III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System umgeschrieben und als cDNA gemessen. Grundsätzlich wurden alle Reaktionen auf Eis durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 10  $\mu$ L in Glaskapillaren durchgeführt. In jeder Kapillare wurde 1  $\mu$ L RNA mit 3,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5% BSA, 0,5  $\mu$ M Primer, 0,15  $\mu$ M Sonden, 4% SuperScript<sup>TM</sup>III RT/ Platinum<sup>®</sup> Taq Mix und 2-x Enzym-Mix vermenget. Die Reaktionskonditionen des LightCyclers waren: 1 Zyklus bei 60°C für 30 Min. (reverse Transkription), 1 Zyklus bei 95°C für 2 Min. (Denaturation), 45 Zyklen zur Amplifikation bei 95°C für 5 sek/ 60°C für 10 sek/ 72°C für 7 sek, (10 sek bei der Amplifikation von HPRT) mit Detektion der Fluoreszenz am Ende des letzten Zyklus. Als Negativ-Kontrolle wurde A. dest. für jede PCR eingesetzt. Isolierte RNA aus dem Ileum von mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten Mäusen wurde als Kalibrator benutzt. Die Fluoreszenz wurde mit der LightCycler Data Analysis Software 3.5 analysiert. Die relative Quantifizierung analysiert die Menge eines Zieltranskripts relativ zu einem internen Standard in der gleichen Probe. Zudem wurden die Proben durch einen in jedem Lauf mitgeführten Kalibrator normalisiert, der das Resultat der PCR bei unterschiedlichen Detektionssensitivitäten korrigierte. Die Ergebnisse wurden als Konzentrationsverhältnis zwischen Zielgen und dem internen Standard geteilt durch Zielgen/interner Standard-Konzentrationsverhältnis des Kalibrators angegeben. Die PCR-Effizienz wurde zuerst für jedes Primer-Paar mittels 5 verschiedener Verdünnungen der Kalibrator-RNA als Quadruplikat ermittelt. Die Expression

von Cp versus dem log der Konzentration erlaubte es, eine Kalibrationskurve durch lineare Regression zu erstellen. Die PCR-Effizienz entsprach  $10^{-1/\text{Steigung}}$ . Diese Effizienzen wurden bei der relativen Quantifizierung mittels RelQuant Software berücksichtigt.

### **2.3 Statistische Analysen**

Von mehrfach bestimmten Messwerten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die statistische Signifikanzberechnung erfolgte bei normalverteilten Werten mit dem Student's t-Test. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ( $p < 0,05$ ) lag und statistisch tendenziell angesehen, wenn Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 5% und 7% ( $0,05 < p < 0,07$ ) lag. In jedem Versuch wurden 3-5 Mäuse/Gruppe verwendet. Alle Versuche wurden mindestens 2x wiederholt, wenn nicht anders angezeigt.

### 3. Ergebnisse

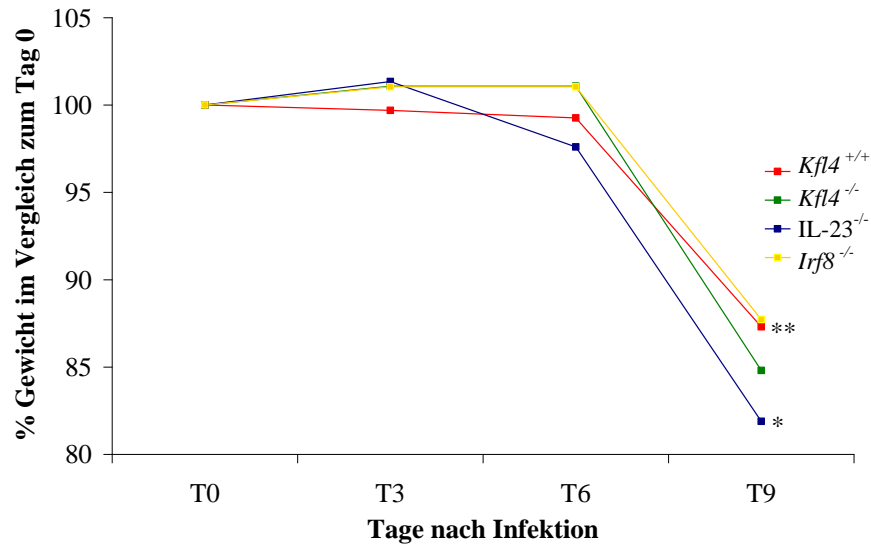
Um zu klären, ob der Transkriptionsfaktor Klf4 die Induktion einer Th1- oder Th17-Antwort beeinflusst, wurde die lokale und systemische Immunantwort in Ileum, MLN, Milz und Serum von *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf dem C57BL/6-Hintergrund nach oraler Infektion mit *T. gondii* untersucht. Neben der protektiven Th1- Immunantwort, die sich nach Infektion mit 10 Zysten des Parasiten entwickelt, wurde auch die Entwicklung einer pathologischen Th1-Antwort mit intestinaler Immunpathologie nach Infektion mit 100 Zysten untersucht. *IL-23*<sup>-/-</sup> und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse dienten als Kontrollen für die Entwicklung der protektiven bzw. pathologischen Th1-Antwort.

#### 3.1 Verlauf der oralen Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*

##### 3.1.1 Gewichtsverlust und klinische Symptome

Als Parameter für die Schwere der Erkrankung wurde das Gewicht der Mäusen den Tagen 3, 6 und 9 nach Infektion mit dem naiver Tiere verglichen. An Tag 9 hatten Mäuse in allen Gruppen bis zu 18,1% ihres Ausgangsgewichts verloren (Abb. 4). Der Gewichtsverlust der infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-, nicht aber der infizierten *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse war im Vergleich zu den Ausgangsgewichten signifikant. Das Gewicht unterschied sich nicht signifikant zwischen naiven und infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Während *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen signifikanten Gewichtsverlust gegenüber naiven Kontrolltieren zeigten, wiesen nur die *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse an Tag 9 ausgeprägte Krankheitssymptome wie raues Fell und Apathie auf.





**Abb. 4: Gewichtsverlauf (prozentual) nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* der *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>-, *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>- Mäuse im Vergleich zum Tag 0. \*, p<0,05 und \*\*, p<0,01.**

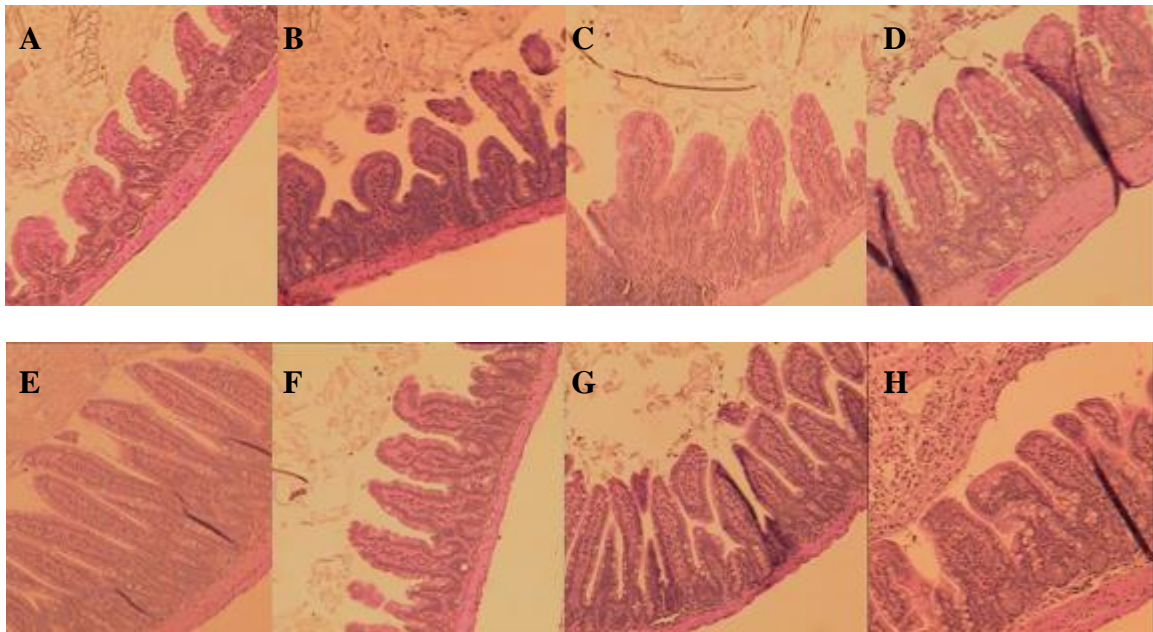
Diesen Daten weisen darauf hin, dass der Gewichtsverlust in diesen Tieren nicht direkt mit der Schwere der Erkrankung korreliert ist. *Irf8*, nicht aber *Klf4*, scheint einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung nach Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* zu haben.

### 3.1.2 Histologische Veränderungen in Ileum und Leber

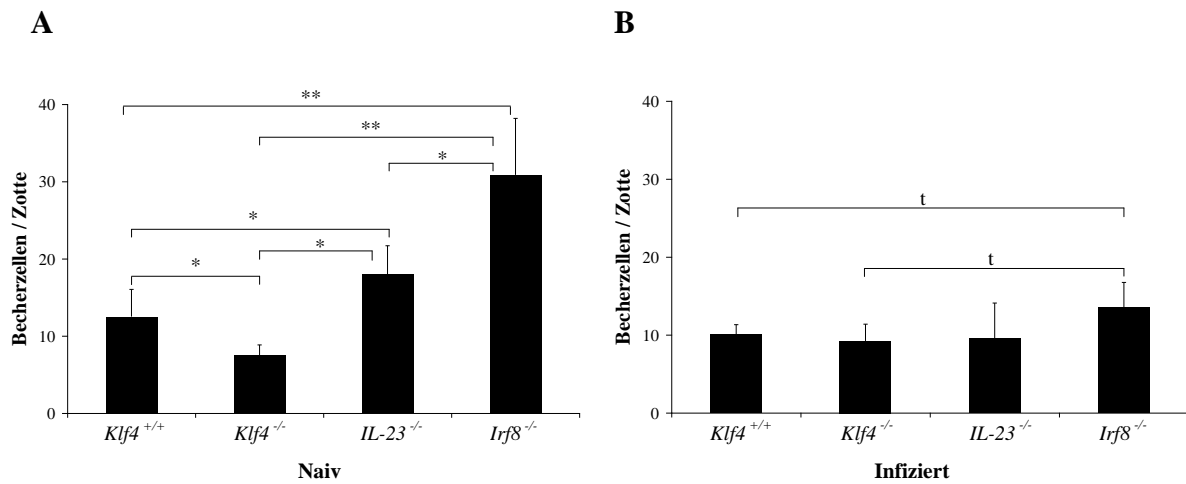
Neben dem Gewicht der Tiere wurden auch histopathologische Veränderungen in Ileum und Leber erfasst. Abb. 5 zeigt H&E-gefärbte Schnitte des Ileums von naiven und mit 10 Zysten infizierten Tieren (Tag 9 post infectionem). Die charakteristische Architektur des Ileums war in allen naiven Tieren erhalten. Die naiven *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse hatten allerdings eine signifikant geringere Zahl an Becherzellen im Vergleich zu naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse (Abb. 5A-D, Abb. 6A). *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten die höchste Zahl an Becherzellen.

Nach Infektion mit 10 Zysten fanden sich bei *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen, nicht aber bei *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen, inflammatorische Veränderungen im Ileum, wie ödematöse Schwellungen zwischen Lamina propria und Epithel, und ein vorwiegend zelluläres Material

enthaltendes Transsudat im Darminhalt (Abb. 5E-H). Die Infektion hatte in *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu naiven Tieren keinen Einfluss auf der Zahl an Becherzellen (Abb. 6A, B). Im Gegensatz dazu zeigten die *IL-23*<sup>-/-</sup>- (1,9 fach) ( $p < 0,05$ ) und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse (2,3 fach) ( $p < 0,01$ ) eine signifikante Abnahme der Zahl an Becherzellen nach der Infektion im Vergleich zu naiven Mäusen. Die Zahl der Becherzellen unterschied sich nicht signifikant zwischen infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 6B). Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse zeigten eine tendenziell geringere Zahl an Becherzellen als infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse.

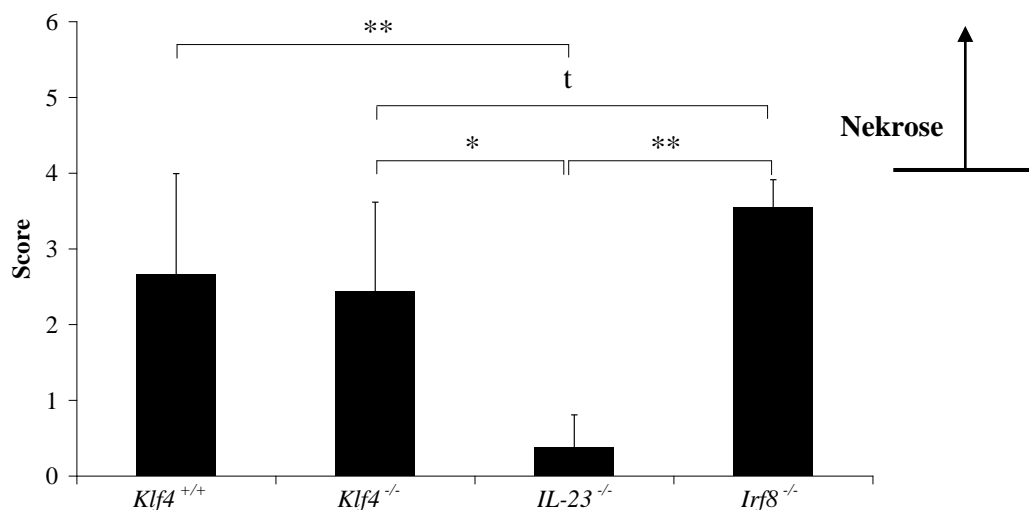


**Abb. 5: H&E-gefärbte Ileumschnitte von naiven (A bis D) und mit 10 Zysten *T. gondii* infizierten Mäusen (E bis H) (10x Vergrößerung). A: naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Maus. B: naive *Klf4*<sup>-/-</sup>-Maus. C: naive *IL-23*<sup>-/-</sup>-Maus. D: naive *Irf8*<sup>-/-</sup>-Maus. E: infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Maus. F: infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Maus. G: infizierte *IL-23*<sup>-/-</sup>-Maus. H: infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Maus.**



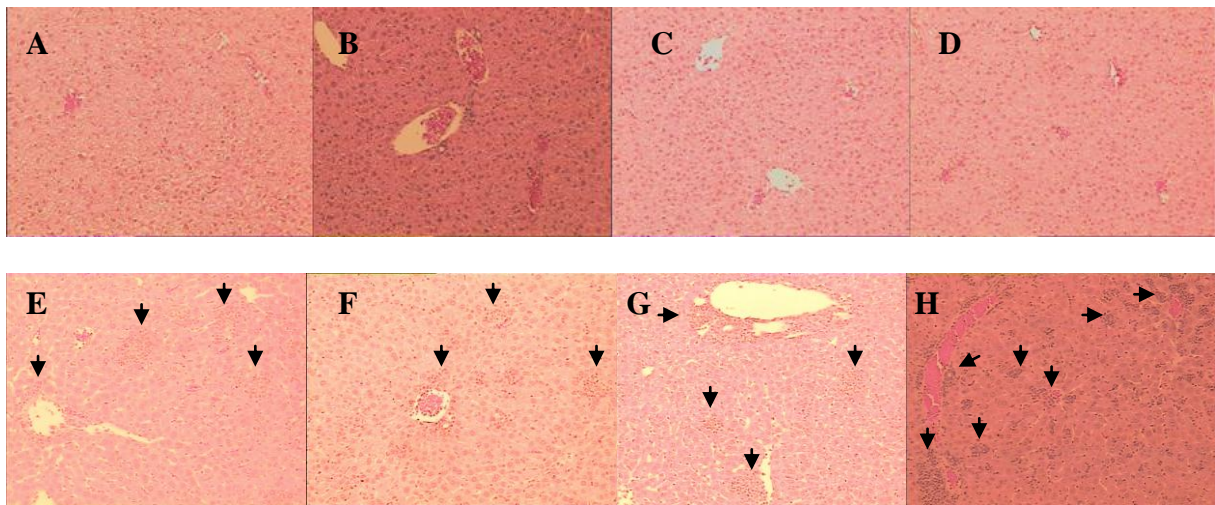
**Abb. 6:** Becherzellzahl im distalen Ileum von naiven (A) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, Tag 9 post infectionem). t,  $p < 0,07$ ; \*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,001$ .

Um die histologischen Veränderungen im Ileum zu quantifizieren, wurde der von Heimesaat et al. 2006 [51] beschriebene Histo-Score bestimmt. Die infizierten *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen im Vergleich zu den *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen keine signifikant unterschiedlichen histopathologischen Veränderungen auf. *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten die geringsten histopathologischen Veränderungen im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abb. 7).

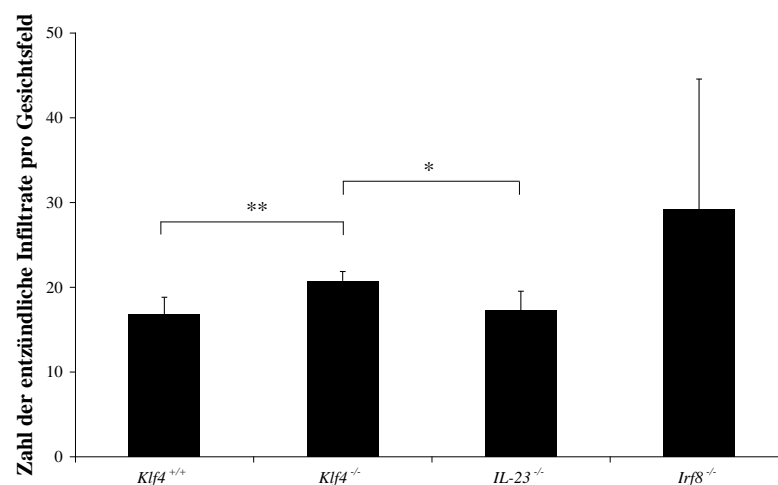


**Abb. 7:** Histopathologischer „Score“ der Darmpathologie an Tag 9 nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* ME49. t,  $p < 0,07$ ; \*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ .

Neben dem Ileum wurde auch die Leber aller Tiere an Tag 9 nach Infektion histologisch auf entzündliche Infiltrate hin untersucht (Abb. 8). Die *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im Vergleich zu den *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant mehr Entzündungsareale (Abb. 8, 9). Die *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine erhöhte Zahl an Infiltraten, vergleichbar an Größe und Kompaktheit mit den anderen Gruppen.



**Abb. 8:** H&E-Färbung der Leber der naiven (oben) und mit 10 Zysten infizierten Tiere (unten). A: naive *Klf4*<sup>+/+</sup>Maus. B: naive *Klf4*<sup>-/-</sup>-Maus. C: naive *IL-23*<sup>-/-</sup>-Maus. D: naive *Irf8*<sup>-/-</sup>-Maus. E: infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Maus. F: infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup> Maus. G: infizierte *IL-23*<sup>-/-</sup>-Maus. H: infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Maus. Die entzündlichen Infiltrate sind mit Pfeilen markiert.

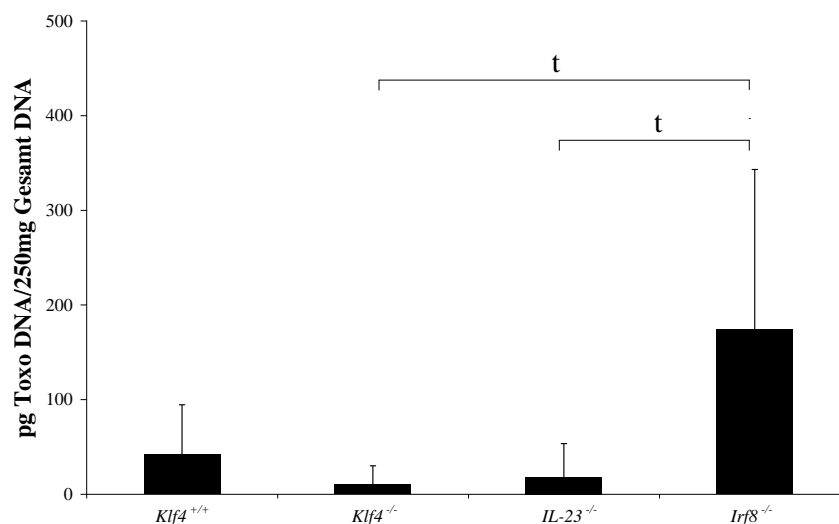


**Abb. 9:** Anzahl der Entzündungsareale in der Leber von Mäuse 9 Tage nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* (100x Vergrößerung). \*, p<0,05 und \*\*, p<0,01.

Zusammenfassend unterscheiden sich naive und infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht wesentlich von naiven und infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen in Bezug auf die intestinale Architektur. Interessanterweise fanden sich bei naiven *Klf4*<sup>-/-</sup>-Tieren verminderte Becherzellzahlen, was darauf hindeutet, dass die Vav Cre vermittelte Deletion von Klf4 auch in Becherzellen auftritt. In der Leber scheint Klf4 die Einwanderung von Immunzellen zu regulieren.

### 3.1.3 Parasitenlast in Darm und Leber

Neben der H&E-Färbung wurde auch eine Immunperoxidasefärbung durchgeführt, um zu klären, ob Klf4 einen Einfluss auf die Parasitenvermehrung in Darm und Leber hat. Da die Parasitenzahlen in Darm und Leber unterhalb der Nachweisgrenze der Immunhistologie lagen, wurde zusätzlich mittels quantitativer PCR die Parasitenlast im Darm durchgeführt. Die Parasitenlast unterschied sich nicht signifikant zwischen *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 10). Die höchste Parasitenlast wurde in *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet.



**Abb. 10:** Parasitenlast in je 1 cm des distalen Ileums von Mäusen 9 Tage nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*. t, p<0,07.

Diese Daten unterstreichen, dass *Klf4* keinen Einfluss auf die Vermehrung des Parasiten hat, während *Irf8* die Vermehrung des Parasiten, vermutlich durch die Produktion von IL-12, kontrolliert.

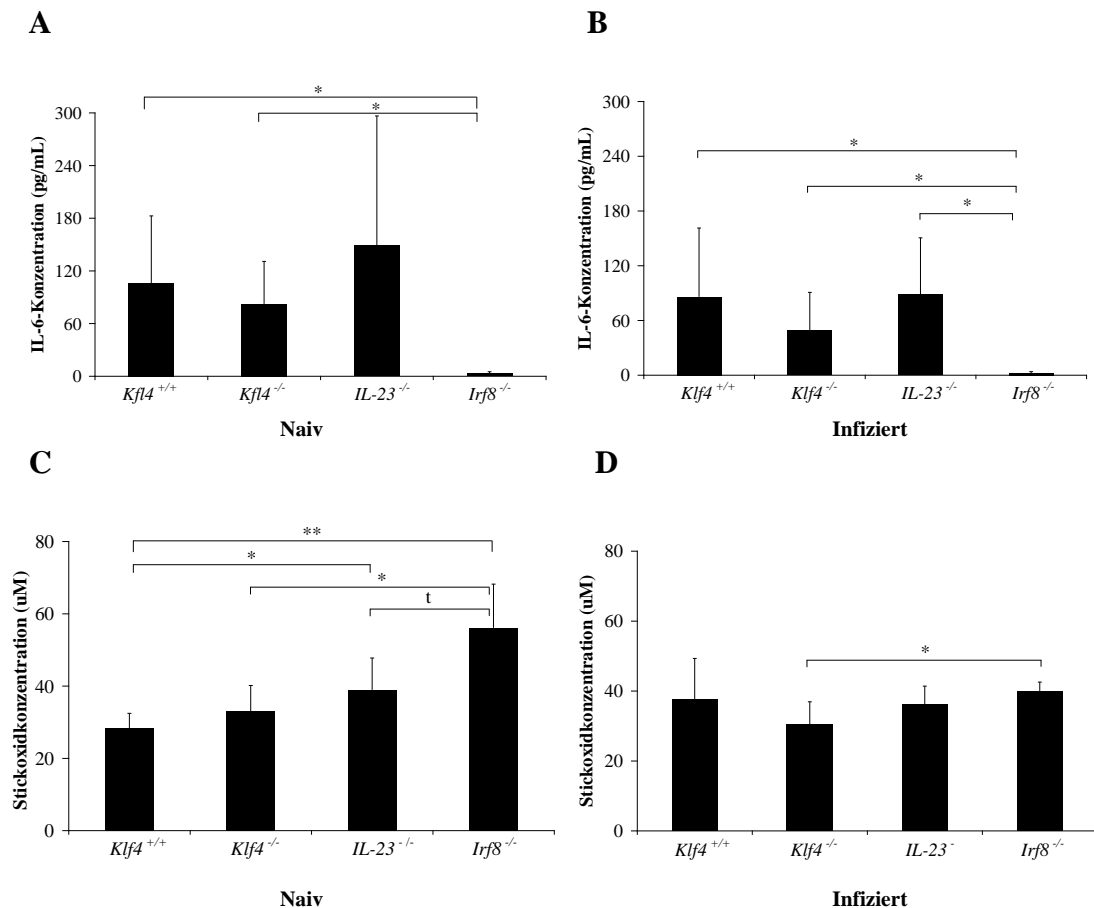
### 3.1.4 Konzentrationen von Entzündungsmediatoren in Serum, Ileum und Milz

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von *Klf4* auf die Immunantwort wurden Entzündungsmediatoren sowie Th1- und Th17-Zytokine an Tag 9 nach Infektion in Serum, Ileum und Milz von *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>-, *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu naiven Kontrollmäusen bestimmt. Die Konzentrationen zwischen Ileum und Milz unterschieden sich nicht signifikant. Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen sind im folgenden dargestellt.

#### 3.1.4.1 IL-6 und Stickoxid-Konzentrationen

Die IL-6-Konzentrationen der naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten keinen signifikanten Unterschied; die naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen jedoch signifikant höhere IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu den naiven *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf (Abb. 11). Unter der Infektion zeigte sich ein ähnliches Bild.

Unter der Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* erhöhten sich die Stickoxid-Konzentrationen tendenziell im Ileum der *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse ( $p < 0,07$ ) und nahm signifikant im Ileum der *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu naiven Mäusen ab (Abb. 11). Naive und infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen keine signifikanten Unterschiede in ihren NO-Konzentrationen auf.



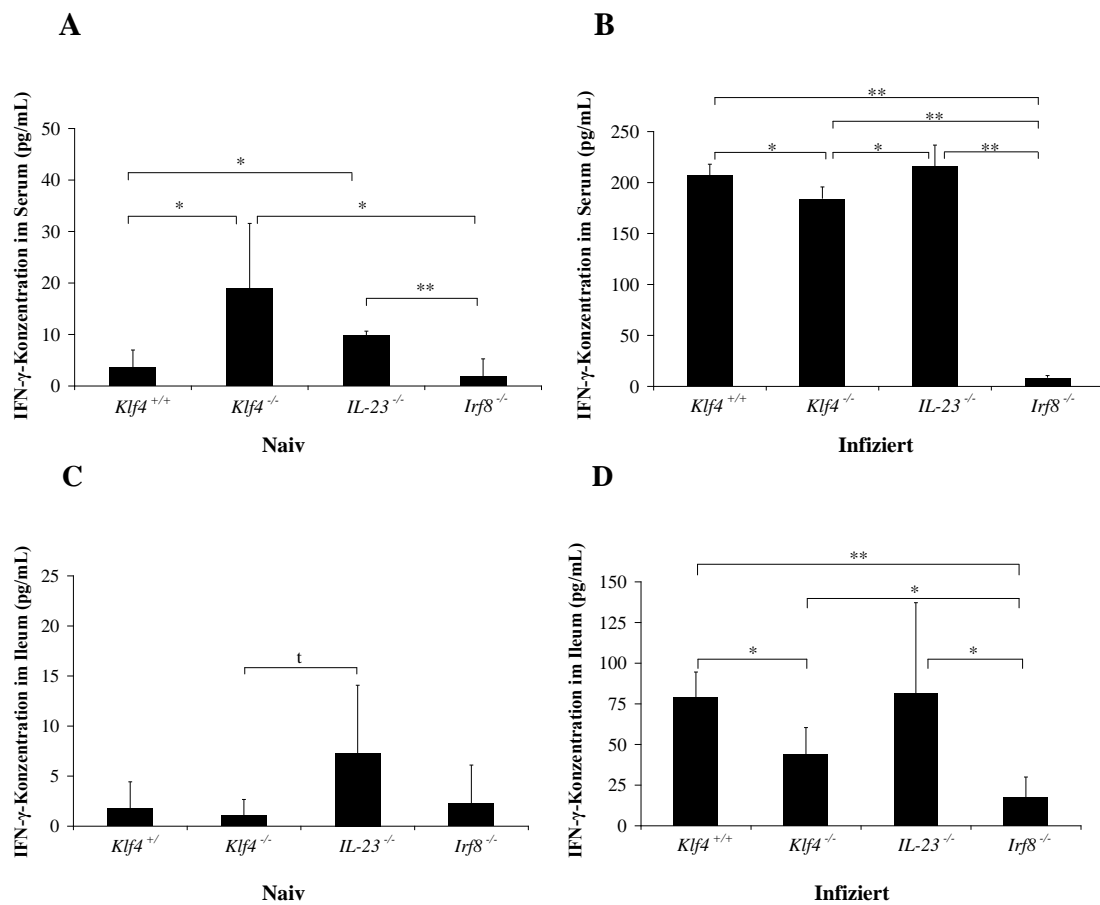
**Abb. 11: IL-6 (A, B) und Stickoxid- (C, D) Konzentrationen im Ileum von naiven (A, C) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem). t,  $p < 0,06$ ; \*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ .**

Da sich die IL-6- und NO- Konzentrationen im Ileum der naiven und infizierten *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht signifikant von denen in *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen unterscheiden, scheint *Klf4* bei der Induktion dieser Entzündungsmediatoren keine Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu wird in Abwesenheit von *Irf8* kein IL-6, wohl aber NO induziert.

### 3.1.4.2 IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum und Ileum

Abb. 12 zeigt die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum und Ileum vor und an Tag 9 nach Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*. Die Infektion resultierte in einer signifikanten Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum ( $p < 0,01$ ) und Ileum ( $p < 0,01$  für *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse und  $p < 0,05$  für *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse) im Vergleich zu naiven Mäusen.

Naive *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im Serum, nicht aber im Ileum, signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen als naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse (4,69 fach) (Abb. 12A und C). Die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum und Ileum der infizierten *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse waren signifikant niedriger als die der infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse (Abb. 12B und D). Infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im Serum und Ileum die niedrigsten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen.



**Abb. 12: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum (A, B) und Ileum (C, D) von naiven (A, C) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem). t,  $p < 0,07$ ; \* $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ . (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)**

Da IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach der Infektion ansteigen, scheint Klf4 an der Induktion einer Th1-Antwort nicht beteiligt zu sein. Die geringeren IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der infizierten *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen aber auf einen hemmenden Einfluss von Klf4 auf die IFN- $\gamma$ -Produktion hin, während *Irf8* die IFN- $\gamma$ -Produktion bekanntermaßen, über die Induktion von IL-12 induziert.



### 3.1.4.3 Konzentrationen von Th17-Zytokinen im Ileum

Um die Entwicklung einer lokalen Th-17-Antwort zu untersuchen, wurden die Zytokine IL-17 und IL-22 im Ileum bestimmt.

Die IL-17- und IL-22-Konzentrationen im Ileum von naiven und infizierten *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 13A-D). Beide Mausstämme zeigten jedoch weder eine Hoch- noch eine Herunterregulation der IL-17- und IL-22-Produktion unter der Infektion. Bei *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen löste die Infektion eine signifikante Abnahme der IL-17- ( $p < 0,01$ ) und IL-22- ( $p < 0,05$ ) Konzentrationen im Ileum aus.

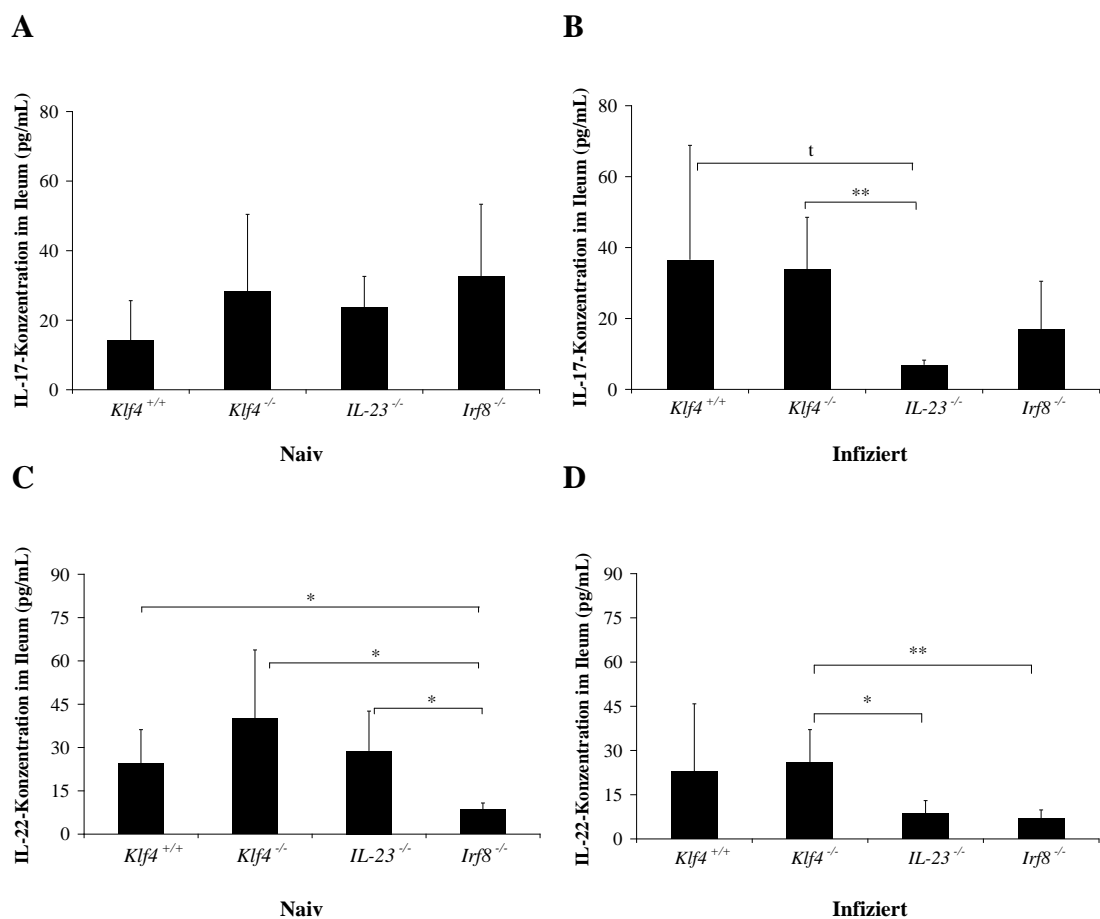


Abb. 13: IL-17- (A, C) und IL-22- (B, D) Konzentrationen im Ileum von naiven (A, C) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem). t,  $p < 0,06$ ; \*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ .

Da die IL-17- und die IL-22-Konzentrationen zwischen naiven und infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen vergleichbar sind, scheint Klf4 keine Rolle bei der Induktion einer lokalen Th17-Antwort im Darm zu spielen. Während die Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* keine Induktion einer Th-17-Antwort verursachte, ist IL-23 essentiell, um die IL-17- und IL-22-Produktion im Darm aufrechtzuerhalten.

### **3.1.5 Bestimmung der Zytokin-Sekretion der Leukozytenpopulationen in mesenterialen Lymphknoten und Milz**

Zur Identifikation der Zytokine-sezernierenden Leukozytenpopulationen wurde an Tag 9 nach Infektion intrazellulär die Expression von IFN- $\gamma$  und IL-17 in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der MLN und Milz bestimmt. Darüber hinaus wurde die relative Prozentzahl von sog. inflammatorischen Monozyten (CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>), dendritischen Zellen (CD11c<sup>+</sup>), T-Zellen (CD3<sup>+</sup>), B-Zellen (B220<sup>+</sup>) und neutrophilen Granulozyten (CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>) bestimmt. Die Frequenz der Zytokin-produzierenden Zellen unterschied sich nicht signifikant zwischen Ileum und Milz.

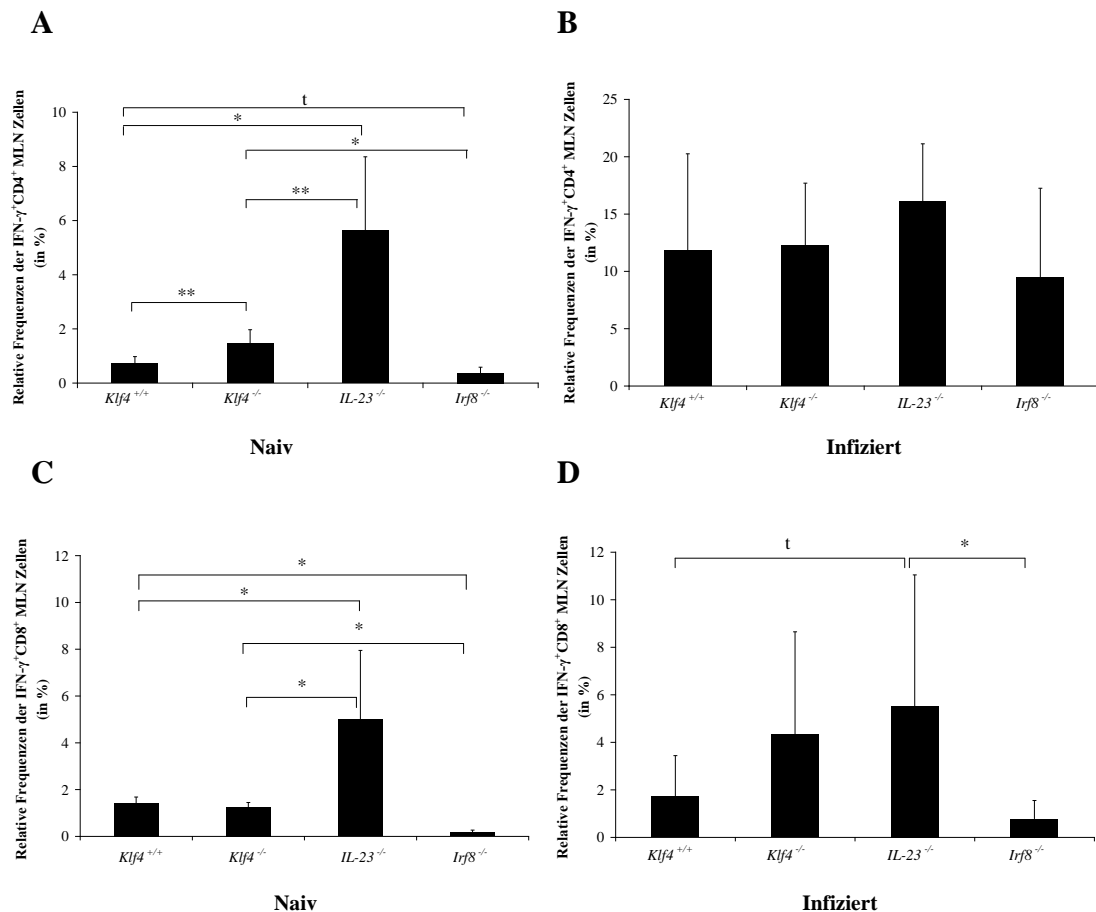
#### **3.1.5.1 IFN- $\gamma$ - und IL-17-Produktion in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der mesenterialen Lymphknoten**

Abb. 14 zeigt die durchflusszytometrisch bestimmten relativen Prozentzahlen von IFN- $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in MLN der naiven und infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>-, *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Naive *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen signifikant höhere Anzahl von CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -Produzenten als *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen in MLN auf. Zwischen naiven *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen bestand kein signifikanter Unterschied in der Frequenz von CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -Produzenten. Naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse

wiesen signifikante niedrigere relative Prozentzahlen an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ -Produzenten im Vergleich zu naiven *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf. Die Frequenzen an IFN- $\gamma$  Produzenten waren jedoch im Vergleich zu naiven *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erhöht.

Nach Infektion mit 10 Zysten zeigten *Klf4*<sup>+/+</sup>- (16,68 fach) und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse (8,01 fach) eine signifikante Erhöhung der Anzahl von IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup>- Zellen in MLN (p<0,01), während der Frequenz von IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup>-Zellen sich nicht signifikant unterschied. Infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine ähnliche Häufigkeit an IFN- $\gamma$ -Produzenten in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen auf. Im Vergleich zu infizierten *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen war der prozentuale Anteil von IFN- $\gamma$ -Produzenten in CD8<sup>+</sup>-Zellen, nicht aber CD4<sup>+</sup>-Zellen, bei *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen tendenziell geringer (p<0,07). Infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im Vergleich zu infizierten *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant geringere Frequenzen an CD8<sup>+</sup>- nicht aber CD4<sup>+</sup>-IFN- $\gamma$ -Produzenten.



**Abb. 14: Durchflusszytometrische Messung der relativen IFN- $\gamma$  Frequenzen an CD4<sup>+</sup> (A, B) und CD8<sup>+</sup> (C, D) T-Zellen der MLN von naiven (A, C) und mit *T. gondii* infizierten Tiere (B, D; Tag 9 post infectionem). t, p<0,07 und \*, p<0,05. (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)**

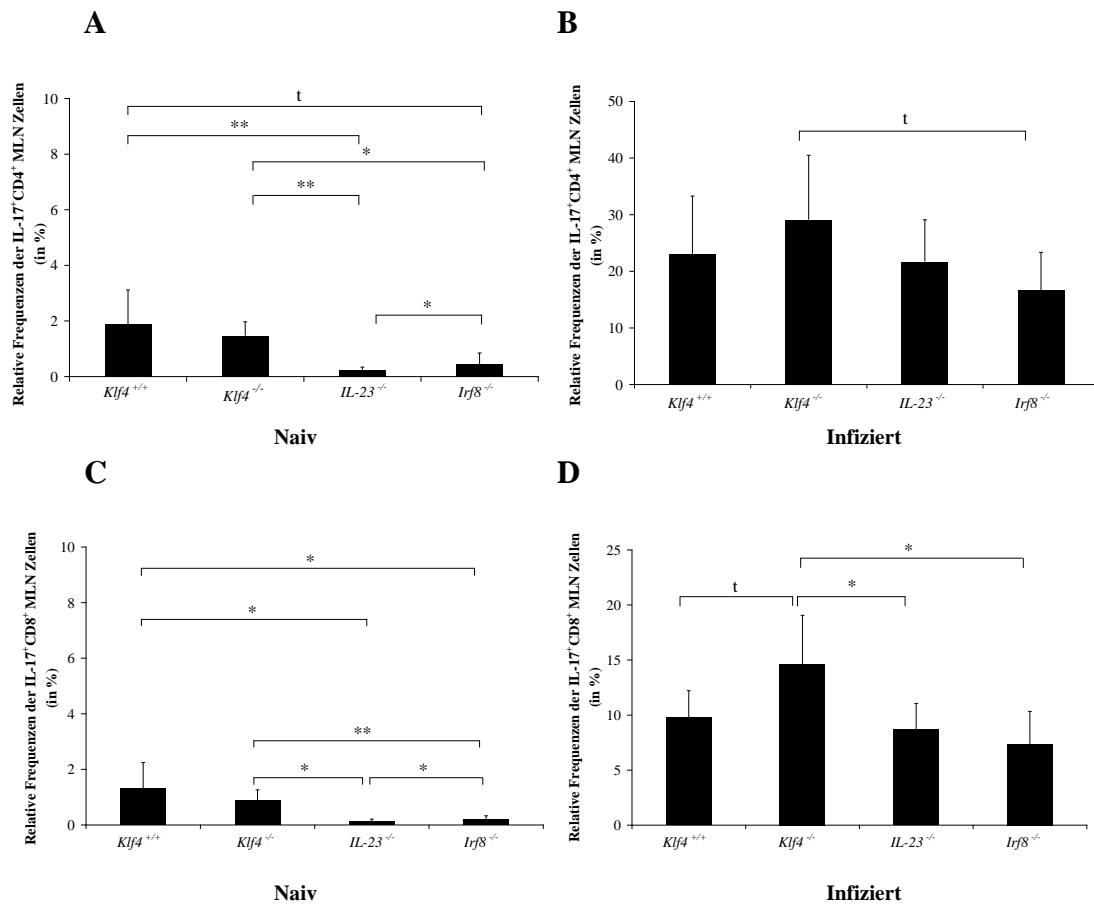
Nach der Infektion zeigte sich, wie oben bereits mittels ELISA gezeigt, eine signifikante Zunahme der IFN- $\gamma$ -Sekretion in MLN CD4<sup>+</sup>-Zellen bei *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>-, *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Diese Daten zeigen, dass *Klf4* nicht an der *T. gondii* induzierte lokale Th1-Antwort beteiligt ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des IFN- $\gamma$ -ELISA in Serum und Ileum unterschied sich die Frequenz an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-IFN- $\gamma$ -Produzenten zwischen *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen vor und nach der Infektion mit 10 Zysten in MLN nicht. *Klf4* scheint die IFN- $\gamma$ -Produktion durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen unter der Infektion in MLN somit nicht zu beeinflussen. Da naive *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant höhere Anzahl an IFN- $\gamma$ -produzierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen aufweisen, könnten sowohl *IL-23* als auch *Klf4* für die Differenzierung von IFN- $\gamma$  produzierenden T-Helferzellen verantwortlich sein.

Die *IL-17*-Produktion unterschied sich weder in CD4<sup>+</sup>- noch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zwischen naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>- Mäuse wiesen jedoch signifikant höhere prozentuale Anteile an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> *IL-17*-Produzenten als naive *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf.

Nach der Infektion war die relative Frequenz von *IL-17*-produzierenden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen in MLN sowohl bei *Klf4*<sup>+/+</sup>- (12,26 fach und 7,33 fach), als auch bei *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen (7,85 fach und 5,15 fach) signifikant höher als bei naiven Kontroll-Mäusen (p<0,01) (Abb. 15). Auch die infizierten *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten eine signifikante Zunahme der prozentualen Anteile an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> *IL-17*-Produzenten (p<0,01).

Die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup>- *IL-17*-Produzenten in infizierten *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen war ähnlich wie in infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen, während die prozentualen Anteile der CD8<sup>+</sup>- *IL-17*-Produzenten tendenziell höher als bei infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen waren (p<0,06).



**Abb. 15: Durchflusszytometrische Messung der relativen IL-17 Frequenzen an CD4<sup>+</sup> (A, B) und CD8<sup>+</sup> (C, D) T-Zellen der MLN von naiven (A, C) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem). t, p<0,06; \*, p<0,05 und \*\*, p<0,01. (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)**

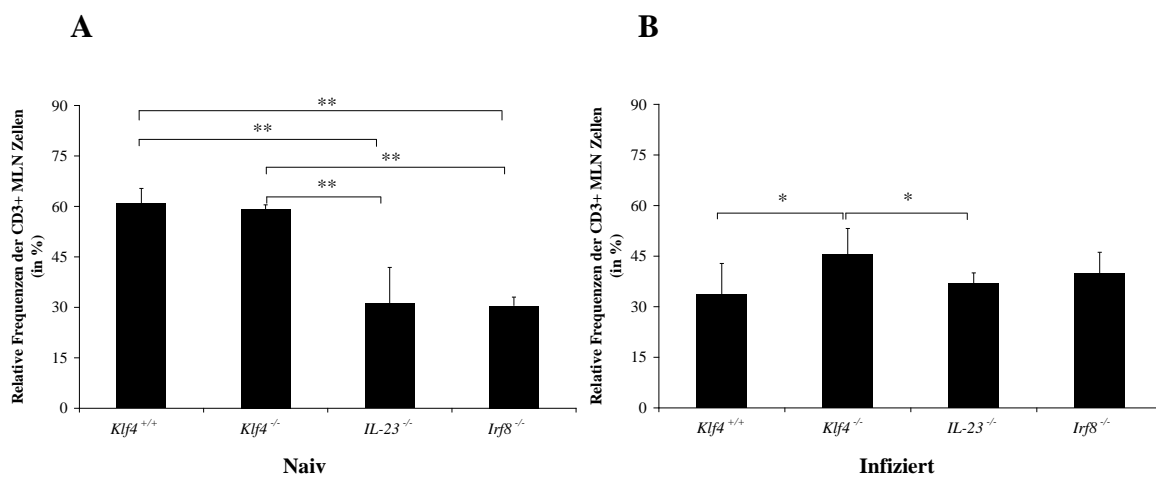
Anders als im Ileum (ELISA), wo die IL-17-Konzentrationen nach der Infektion unverändert gegenüber naiven Mäusen war, fiel in MLN eine signifikante Zunahme der Häufigkeit an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-IL-17-Produzenten auf. Die IL-17-Produktion scheint somit gleichermaßen durch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen in MLN gleichermaßen bedingt zu sein.

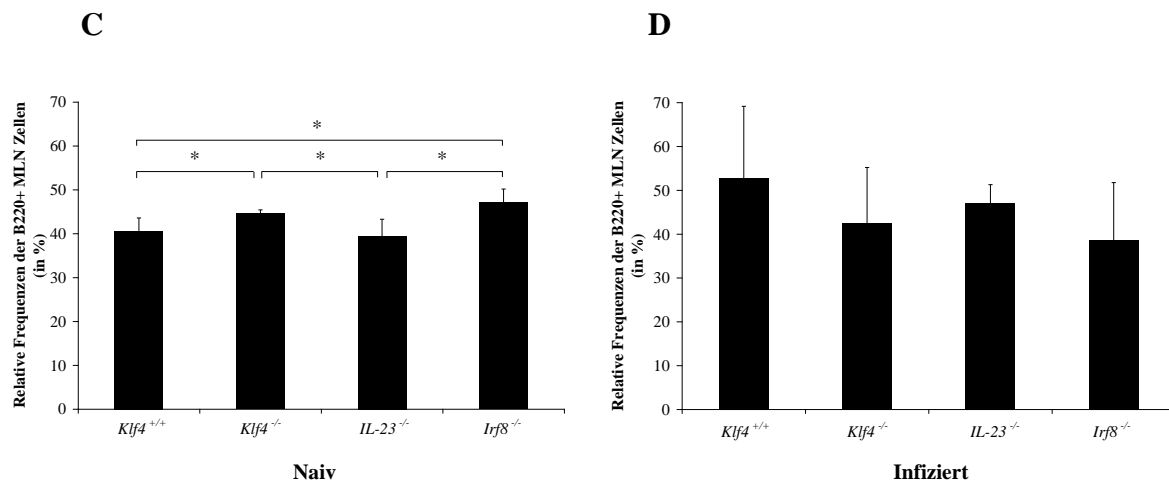
Da die Frequenz an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-IL-17-Produzenten zwischen *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen vor und nach der Infektion mit 10 Zysten nicht unterschiedlich ist, scheint *Klf4* nicht die IL-17-Produktion und Induktion durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen zu beeinflussen.

### 3.1.5.2 T- und B-Zellen in mesenterialen Lymphknoten und in der Milz

Die Infektion löste in *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Verminderung der Frequenz an CD3<sup>+</sup>-Zellen aus ( $p < 0,01$ ). Während sich die Frequenzen an CD3<sup>+</sup>-Zellen zwischen naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht unterscheiden, wiesen infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen höhere Frequenzen an CD3<sup>+</sup>-Zellen auf (Abb. 16A, B).

Naive *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen signifikant höhere prozentuale Anteile an B220<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen auf; im Gegensatz dazu fand sich bei infizierten Mäusen kein signifikanter Unterschied (Abb. 16C, D). Nach Infektion änderte sich die Frequenz von B220<sup>+</sup>-Zellen in *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht, während infizierte *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikante Erhöhung der Frequenz von B220<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu naiven Tieren aufweisen ( $p < 0,05$ ).





**Abb. 16: Durchflusszytometrische Messung der relativen CD3<sup>+</sup> (A, B) und B220<sup>+</sup> (C, D) Frequenzen an Zellen der MLN von naiven (A, C) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem). \*, p<0,05 und \*\*, p<0,01.**

Die erhöhte Frequenz an CD3<sup>+</sup>-Zellen bei Abwesenheit von Klf4 könnte ein Hinweis darauf sein, dass Klf4 die Induktion von CD3<sup>+</sup>-Zellen beeinflusst.

### 3.1.5.3 Relative Prozentzahl von Granulozyten und Monozyten in den mesenterialen Lymphknoten

Der prozentuale Anteil von Granulozyten (CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup>) war zwischen naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Tieren ähnlich (Abb. 17A). Naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen jedoch einen signifikant höheren prozentualen Anteil an Granulozyten als *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf, während der Anteil an Granulozyten signifikant niedriger als in *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen (3,3 fach) war. Nach der Infektion gab es ein ähnliches Bild. Die *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten, wie erwartet, sowohl vor als auch nach der Infektion den anderen Tieren gegenüber die höchsten prozentualen Anteile an Granulozyten.

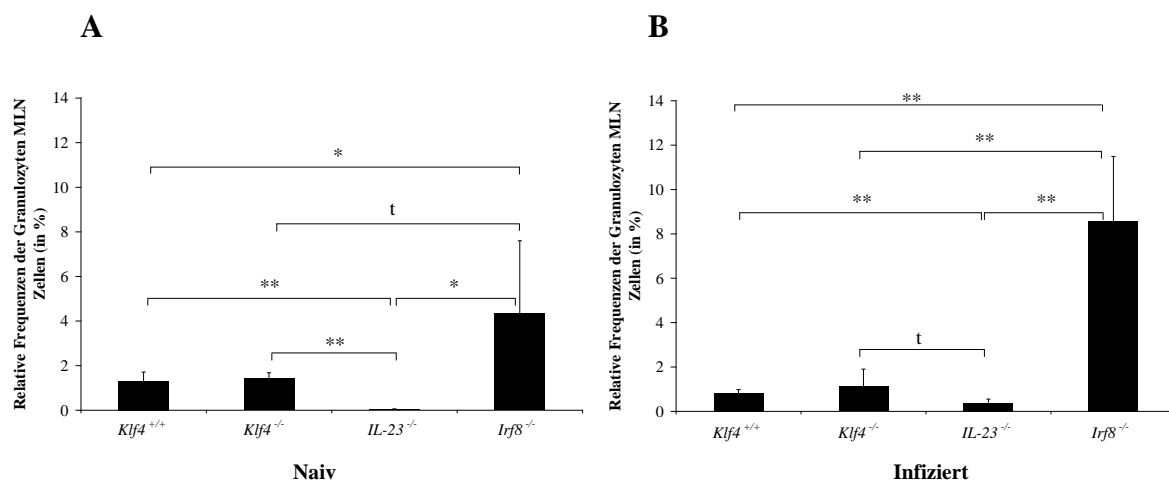
Die Infektion bewirkte eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils an Granulozyten bei *Klf4*<sup>+/+</sup> (p<0,05), nicht aber bei *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu naiven Mäusen (Abb.

17B). *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine signifikante ( $p < 0,01$ ) und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine tendenzielle Zunahme ( $p < 0,07$ ) des prozentualen Anteils an Granulozyten nach der Infektion.

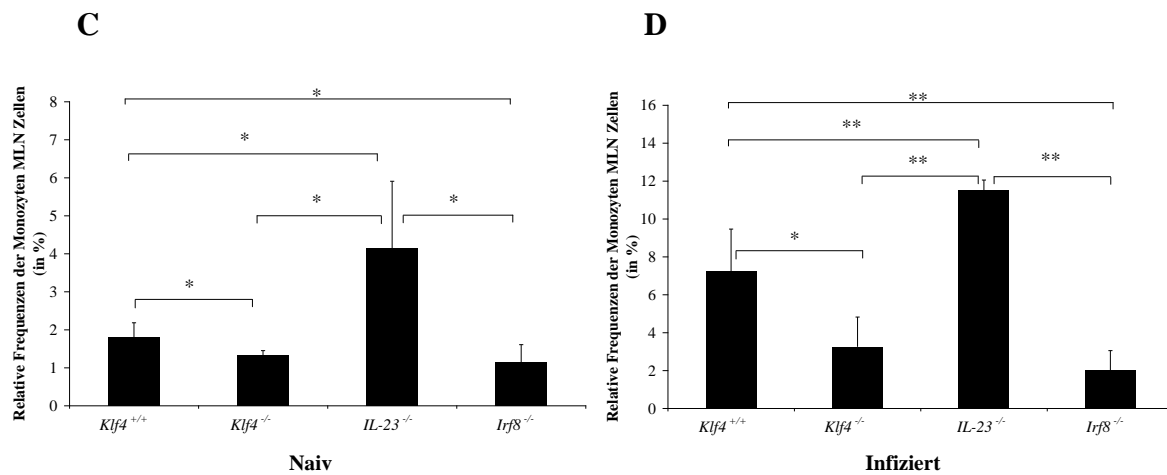
Naive *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen signifikant niedrigere prozentuale Anteile an Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten (CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup>Ly-6G<sup>-</sup>) als naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse auf (Abb. 17C). Naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse hatten signifikant niedrigere prozentuale Anteile an Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten als naive *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse, aber signifikant höhere als naive *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Die Infektion bewirkt eine signifikante Zunahme der prozentualen Anteile an Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten bei *Klf4*<sup>+/+</sup>- (4,0 fach) ( $p < 0,05$ ) und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen (2,3 fach) im Vergleich zu naiven Mäusen (Abb. 17D). Infizierte *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse, nicht aber infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse, zeigten eine signifikante Zunahme der prozentualen Anteile an Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten im Vergleich zu naiven Mäusen.

Infizierten *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten signifikant geringere prozentuale Anteile an Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten als die infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse (2,2 fach) (Abb. 17D). Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse hatten signifikant niedrigere prozentuale Anteile an Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten im Vergleich zu den infizierten *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen, aber signifikant höhere prozentuale Anteile als infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse (3,6 fach). Infizierte *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten sowohl vor als auch nach der Infektion den anderen Tieren gegenüber die höchsten Frequenzen an Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten.







**Abb. 17: Durchflusszytometrische Messung der relativen Granulozyten (A, B) und Monozyten (C, D) Frequenzen der MLN von naiven (A, C) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem). t,  $p < 0,07$ ; \*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ . (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)**

Weil sich die prozentualen Anteile von Granulozyten zwischen *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse vor und nach der Infektion nicht unterscheiden, scheint *Klf4* die Generierung von Granulozyten nicht zu beeinflussen. Da nach der Infektion die Produktion der Granulozyten bei Kontrolltieren, nicht aber bei *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen unterdrückt wird, scheint *Klf4* unter der Infektion jedoch die Generierung von Granulozyten zu hemmen.

*Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten sowohl vor als auch nach der Infektion im Vergleich zu *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen geringere Ly-6C<sup>+</sup>-Monozytenanteile, was darauf hinweist, dass *Klf4* an der Produktion von Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten beteiligt ist.

Interessanterweise haben *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse die höchsten und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse die geringste prozentualen Anteile an Ly-6C<sup>+</sup>-Monozyten. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Differenzierung der Leukozytenpopulation durch IL-23 als auch über die Transkriptionsfaktoren *Irf8* und *Klf4* geregelt wird.

### 3.1.5.4 Relative Prozentzahl von antigenpräsentierenden Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Die Häufigkeit von CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>-Zellen (plasmazytoide DCs) in naiven *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen war tendenziell niedriger als in naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen (Abb. 18A). Naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen signifikante höhere prozentuale Anteile von CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>-Zellen im Vergleich zu naiven *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf.

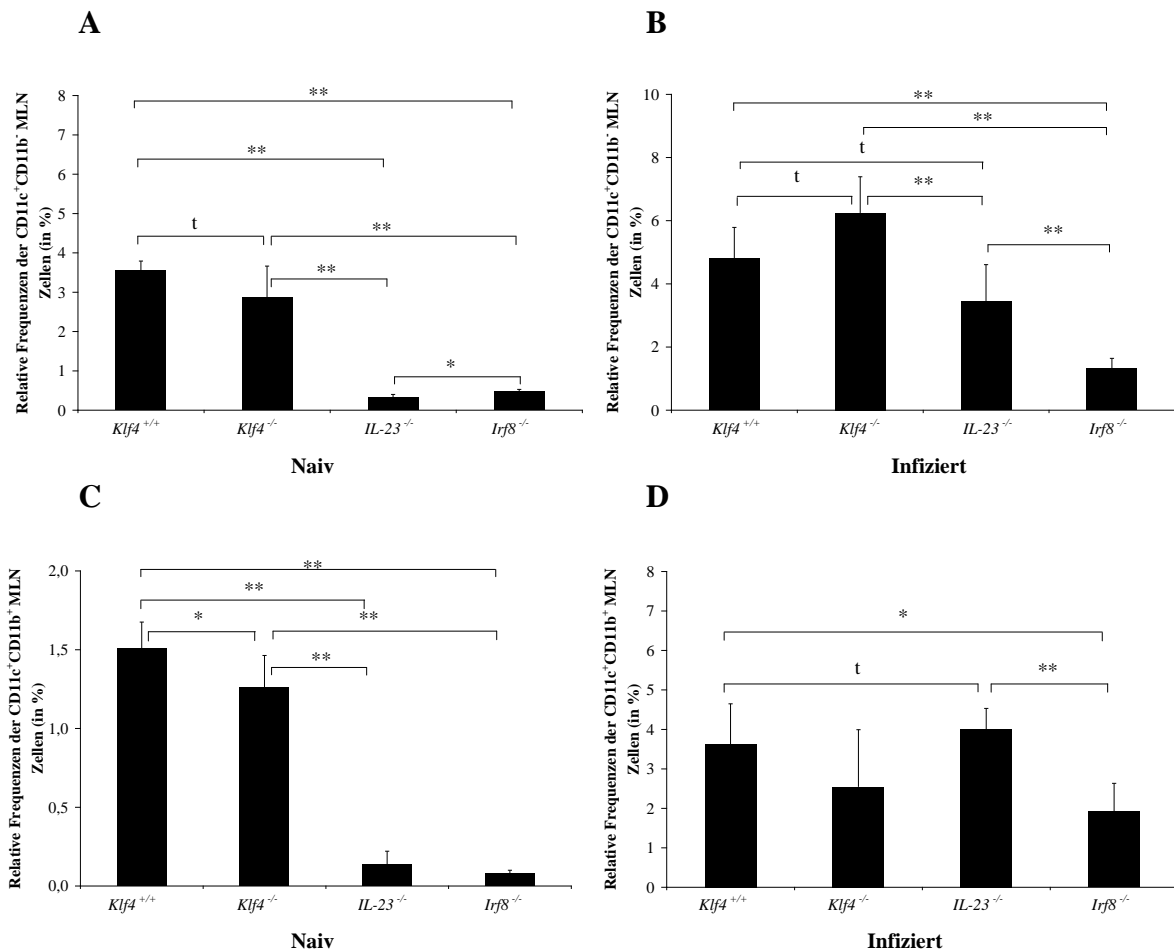
Nach der Infektion fand sich eine signifikante Zunahme der Häufigkeit der CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>-Zellen bei *Klf4*<sup>+/+</sup>- ( $p < 0,05$ ), *Klf4*<sup>-/-</sup>- ( $p < 0,01$ ), *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu naiven Tieren (Abb. 18B).

Infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen tendenziell höhere relative Frequenzen an CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>-Zellen im Vergleich zu infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen auf. Die prozentualen Anteile waren in infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant höher als in infizierten *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen und tendenziell höher als in infizierten *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 18B).

Die Häufigkeit der CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen (myeloide DCs) unterschied sich nicht in MLN der naiven *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 19C). Naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen aber signifikant höhere relative Frequenzen an CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen als *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf.

Nach der Infektion erhöhte sich die Häufigkeit der CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen signifikant in *Klf4*<sup>+/+</sup>- ( $p < 0,01$ ) und tendenziell in *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p < 0,07$ ) im Vergleich zu naiven Tieren (Abb. 18D). Auch *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen nach der Infektion eine signifikante Zunahme der Häufigkeiten an CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen auf ( $p < 0,01$ ).

Zwischen infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen fanden sich keine unterschiedlichen Häufigkeiten an CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 18D). Der prozentuale Anteil an CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen war in infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen jedoch tendenziell höher als in infizierten *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p < 0,07$ ).



**Abb. 18:** Durchflusszytometrische Messung der relativen CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> (A, B) und CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (C, D) Zellen der MLN von naiven (A, C) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem). t, p<0,06; \*, p<0,05 und \*\*, p<0,01. (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)

Da sich die Häufigkeiten der CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>-Zellen zwischen *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen vor und nach der Infektion nicht signifikant unterscheiden, scheint *Klf4* die Generierung von CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>-Zellen nicht zu beeinflussen, während ein Einfluß von *Klf4* auf CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

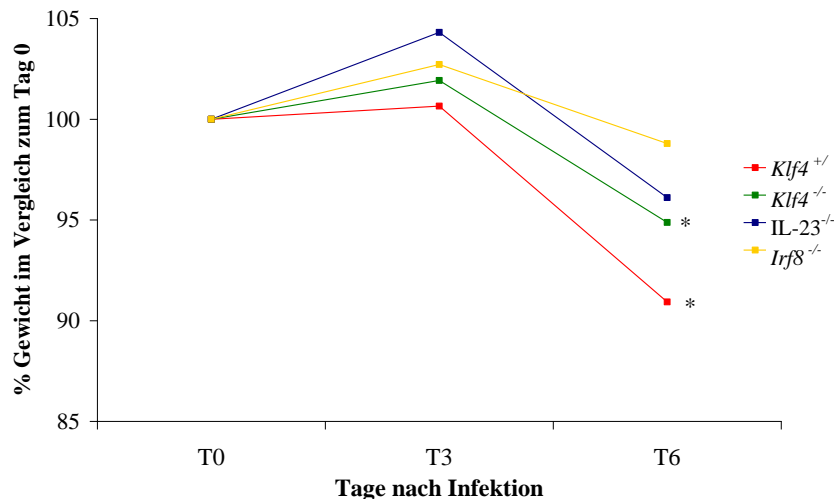
### 3.2 Verlauf der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*

Um den Einfluß von Klf4 auf überschüssige Immunantworten zu untersuchen, wurde als Mausmodell der *T. gondii*-induzierten Pan-Ileitis nach oraler Infektion mit 100 Zysten verwendet.

#### 3.2.1 Gewichtsverlust und klinische Symptome

Alle Untersuchungsgruppen wiesen ab Tag 5 zunehmend gestäubtes Fell und eine gekrümmte Haltung auf. Die klinischen Krankheitszeichen, insbesondere die gekrümmte Haltung, waren bei *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich stärker ausgeprägt als bei den anderen Gruppen.

Nach anfänglicher leichter Gewichtszunahme zeigten alle Gruppen ab Tag 6 einen Gewichtsverlust, der im Vergleich zu Tag 0 bei *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant war ( $p < 0,05$ ) (Abb. 19). Ab Tag 6 nach der Infektion wiesen infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse ein tendenziell höhere Gewicht ( $p < 0,06$ ) als infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse auf. Im Vergleich zur Infektion mit 10 Zysten verloren *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits zu einem früheren Zeitpunkt signifikant Gewicht.

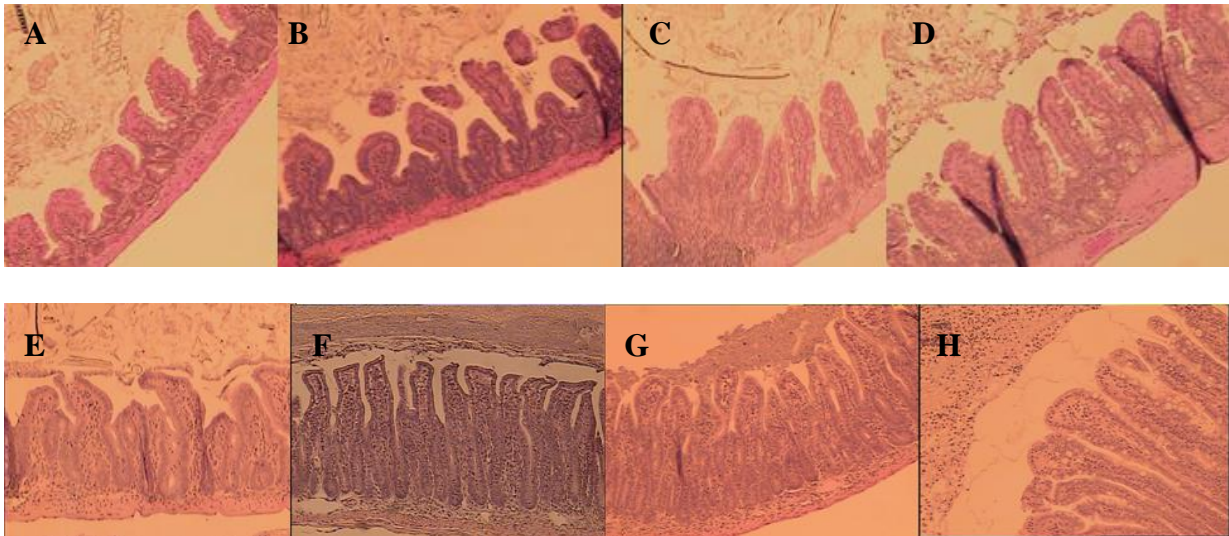


**Abb. 19: Gewichtsverlauf der *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>-, *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>- Mäuse nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. \*, p<0,05 im Vergleich zum Tag 0.**

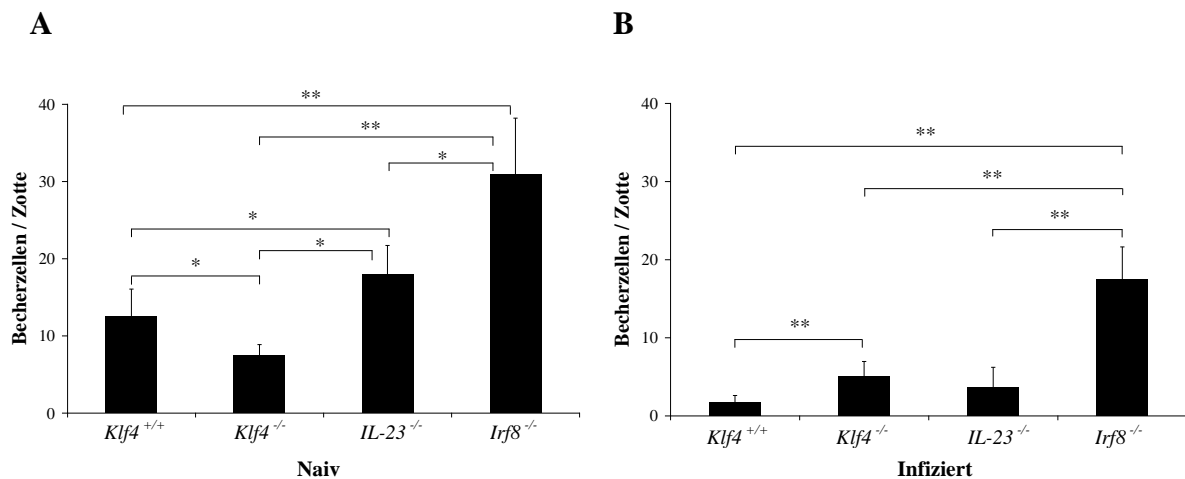
Wie bei der Infektion mit 10 Zysten scheint der Gewichtsverlust bei Infektion mit 100 Zysten nicht direkt mit der Schwere der Erkrankung korreliert zu sein.

### 3.2.2 Histologische Veränderungen in Ileum und Leber

7 Tage nach der Infektion fanden sich bei *Klf4*<sup>-/-</sup>-, *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen, nicht aber bei *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen, intestinale Nekrosen wie sie in Wildtyp-C57BL/6-Tieren beschrieben sind [36-40] (Abb. 20). Die Infektion bewirkte eine signifikante Abnahme der Anzahl an Becherzellen in allen Gruppen im Vergleich zu naiven Tieren (Abb. 21). Infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine signifikant höhere Zahl an Becherzellen als infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse auf. Die Zahl an Becherzellen war bei infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant geringer als bei infizierten *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen.

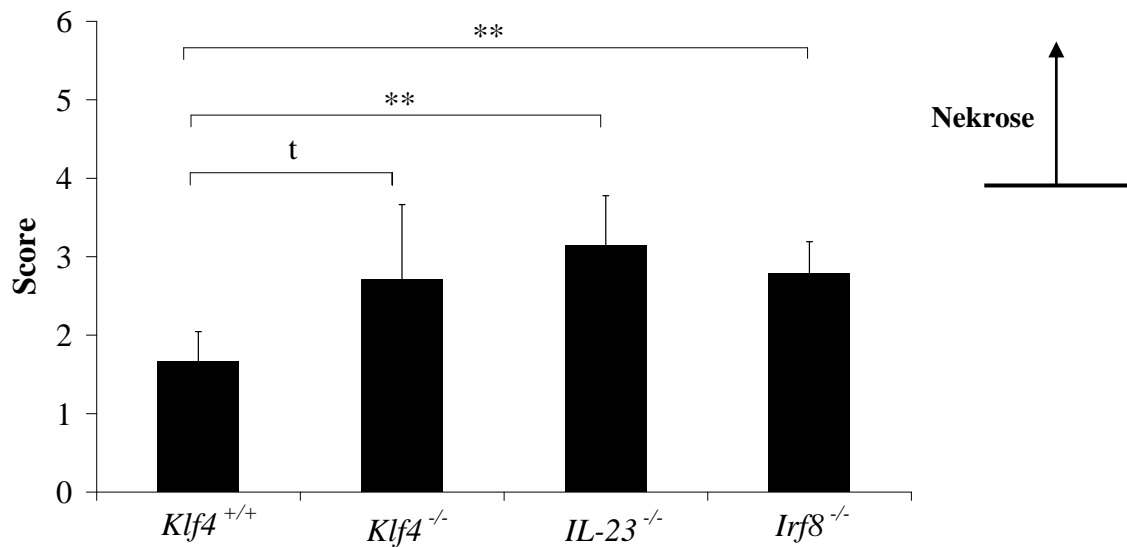


**Abb. 20:** H&E-gefärbte Ileumschnitte von naiven (A bis D) und mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten Mäusen (E bis H) (10x Vergrößerung). A: naive  $Klf4^{+/+}$ -Maus. B: naive  $Klf4^{-/-}$ -Maus. C: naive  $IL-23^{-/-}$ -Maus. D: naive  $Irf8^{-/-}$ -Maus. E: infizierte  $Klf4^{+/+}$ -Maus. F: infizierte  $Klf4^{-/-}$ -Maus. G: infizierte  $IL-23^{-/-}$ -Maus. H: infizierte  $Irf8^{-/-}$ -Maus.



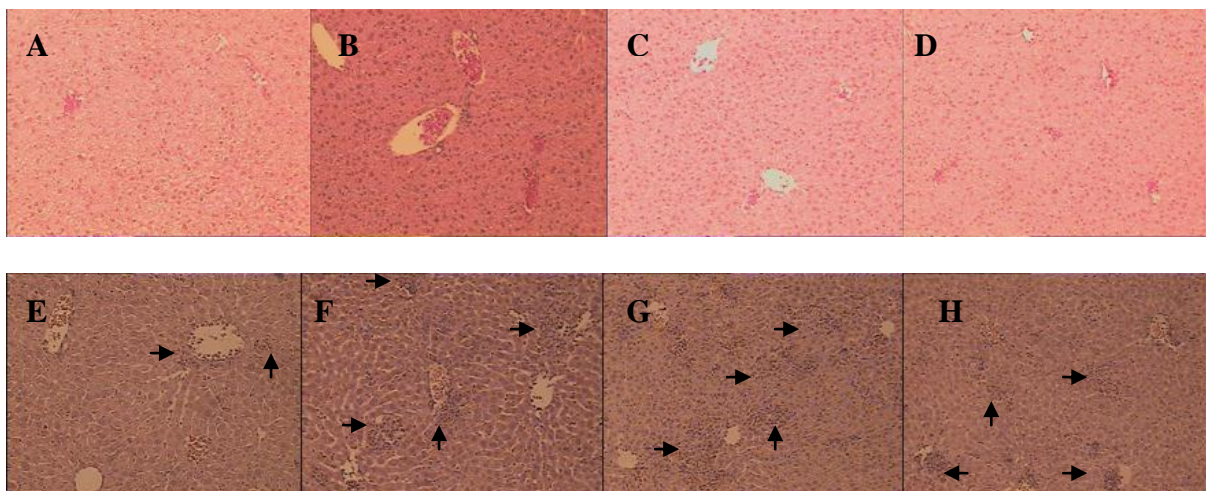
**Abb. 21:** Becherzellzahl in distalem Ileum von naiven (A) und mit *T. gondii* infizierten Tieren (B, Tag 7 post infectionem). \*, p < 0,05 und \*\*, p < 0,001.

Infizierte  $Klf4^{-/-}$ -Mäuse wiesen im Vergleich zu  $Klf4^{+/+}$ -Mäusen tendenziell stärkere histopathologische Veränderungen auf (Abb. 22).  $Irf8^{-/-}$ -Mäuse zeigten die stärksten histopathologischen Veränderungen im Ileum: neben Ödemen zwischen der Lamina propria und der Epithelschicht waren Zelldetritus im Darmlumen und beginnende Nekrosen mit zerstörten Zotten zu beobachten. Die histopathologischen Veränderungen waren bei  $Klf4^{+/+}$ -Mäusen signifikant geringer ausgeprägt als bei  $Irf8^{-/-}$ -Mäusen.



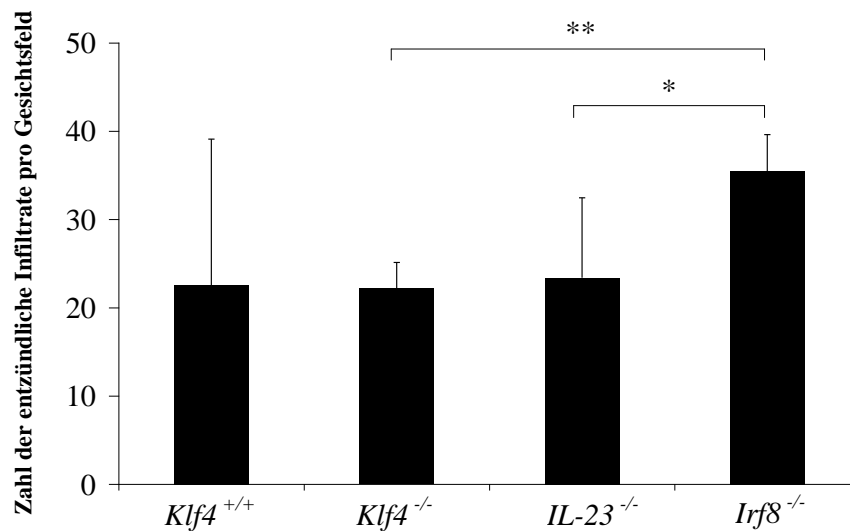
**Abb. 22:** Histopathologischer „Score“ der Darmpathologie an Tag 7 nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. t,  $p < 0,07$  und \*\*,  $p < 0,01$ .

Neben dem Ileum wurde auch die Leber aller Tiere am Tag 7 nach Infektion histologisch auf entzündliche Infiltrate hin untersucht. Abb. 23 zeigt repräsentative Ausschnitte der H&E-gefärbten Leberschnitte.



**Abb. 23:** H&E-gefärbte Leberschnitte von naiven (A bis D) und mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten Mäusen (E bis H) (10x Vergrößerung). A: naive *Klf4*<sup>+/+</sup>-Maus. B: naive *Klf4*<sup>-/-</sup>-Maus. C: naive *IL-23*<sup>-/-</sup>-Maus. D: naive *Irf8*<sup>-/-</sup>-Maus. E: infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Maus. F: infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Maus. G: infizierte *IL-23*<sup>-/-</sup>-Maus. H: infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Maus.

In *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen fanden sich im Vergleich zu *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen keine signifikant unterschiedlichen Zahlen an Entzündungsarealen (Abb. 24).



**Abb. 24:** Anzahl der Entzündungsareale in der Leber von Mäuse 7 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* (bei 100-facher Vergrößerung). \*, p<0,05 und \*\*, p<0,01.

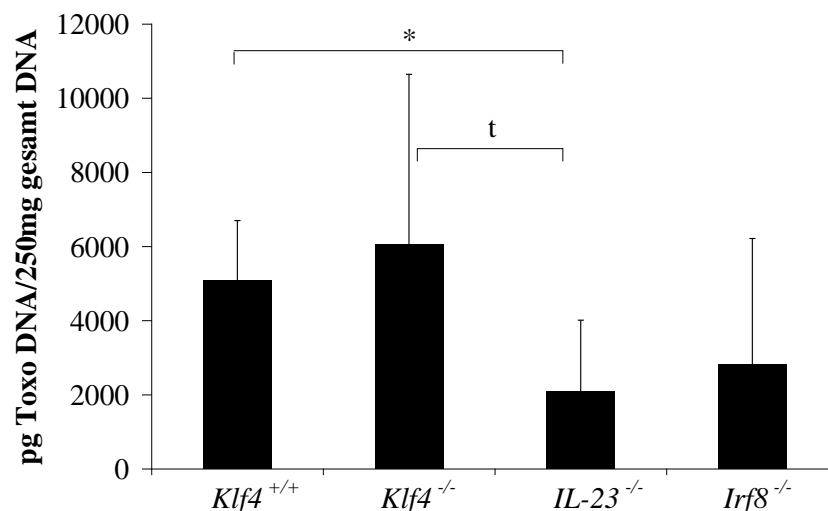
Diese Daten weisen darauf hin, dass die Infektion mit 100 Zysten die Generierung von Becherzellen hemmt, was bei Abwesenheit von *Klf4* geringer ausgeprägt ist. *Irf8* scheint die Generierung der Becherzellen zu hemmen, weil *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse in fast allen Versuchsbedingungen die höchste Zahl an Becherzellen zeigten.

Da die histopathologischen Veränderungen in *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen nicht das Ausmaß der Veränderungen in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen erreicht, scheint die Generierung der Mäuse zu einem resistenteren Phänotyp der *Klf4*-Wildtyp-Mäuse im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen geführt zu haben. Da infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse tendenziell stärkere histopathologische Veränderungen als *Klf4*<sup>+/+</sup>-Kontrollmäuse zeigte, kann ein hemmender Einfluss von *Klf4* auf die Nekrose-Entwicklung nicht vollkommen ausgeschlossen werden.



### 3.2.3 Parasitenlast

Da die exakte histologische Bestimmung der Parasitenzahlen aufgrund sehr hoher Parasitenzahlen erschwert war, wurde eine Quantifizierung der Parasitenzahlen mittels quantitativer PCR durchgeführt. Die Parasitenlasten im Ileum der infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 25). Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse zeigten signifikant höhere Parasitenzahlen im Vergleich zu *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Parasitenzahlen im terminalen Ileum nach Infektion mit 100 Zysten waren erwartungsgemäß deutlich höher als die nach der Infektion mit 10 Zysten.



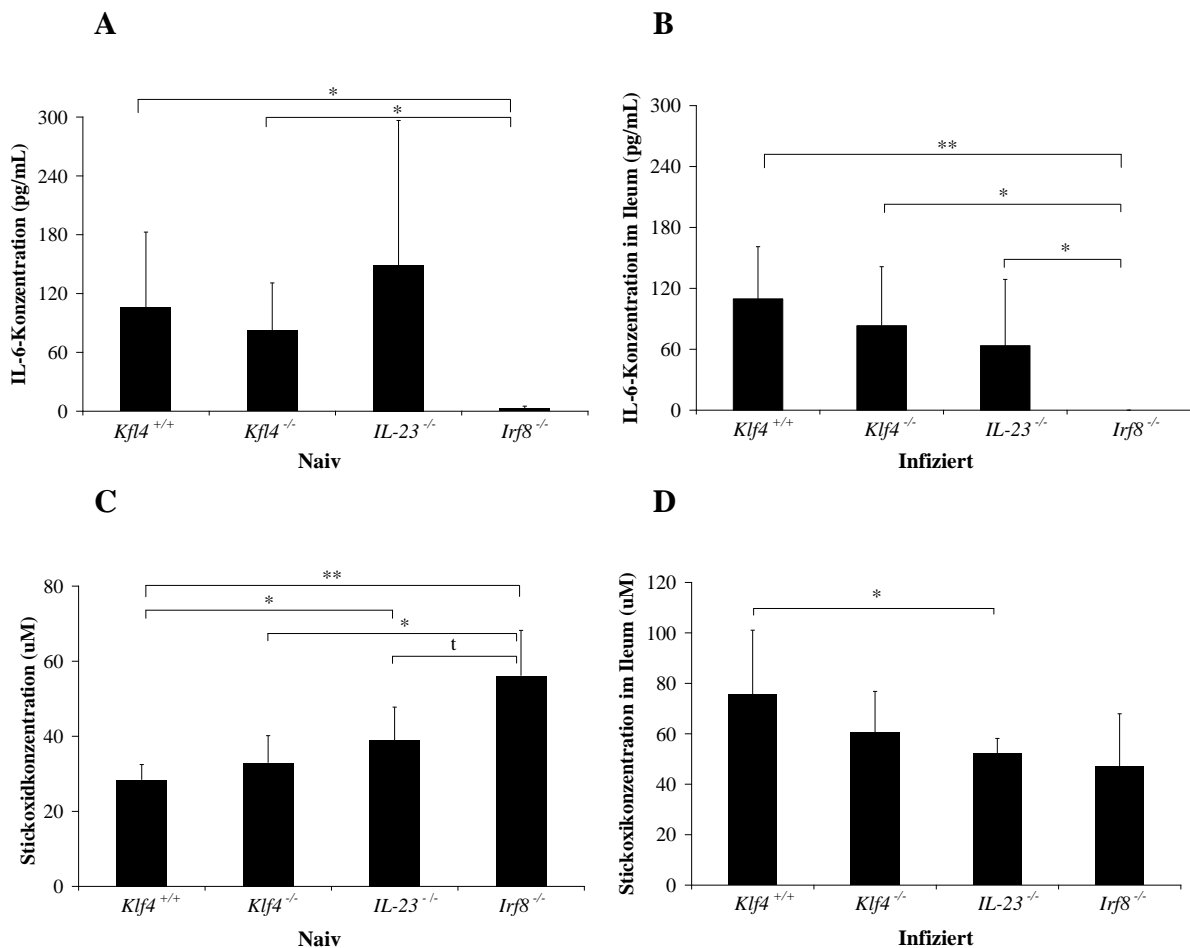
**Abb. 25:** Parasitenlast in je 1 cm des distalen Ileums von Mäusen 7 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. t, p<0,06 und \*, p<0,05.

### 3.2.4 Konzentrationen von Entzündungsmediatoren in Serum, Ileum und Milz

Um die den oben beschriebenen Befunden zugrunde liegenden Immunantworten aufzudecken, wurden Th1- und Th17-Zytokine an Tag 7 nach der Infektion in Serum, Ileum und Milz bestimmt. Die Konzentrationen zwischen Ileum und Milz unterschieden sich nicht signifikant.

### 3.2.4.1 IL-6 und Stickoxid-Konzentrationen

Die Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* beeinflusste die IL-6-Konzentrationen der *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den naiven Tieren nicht. IL-6-Konzentrationen unterschieden sich nicht zwischen infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 26A, B). Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen höhere IL-6-Konzentrationen als infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf. Im Vergleich zu naiven Tieren wiesen *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach der Infektion signifikant höhere NO-Konzentrationen auf ( $p < 0,01$ ) (Abb. 26C, D). Zwischen infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen fand sich kein Unterschied in den NO-Konzentrationen. Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen signifikant höhere NO-Konzentrationen als *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf. Im Vergleich zur Infektion mit 10 Zysten wiesen die mit 100 Zysten infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- ( $p < 0,05$ ), *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $p < 0,01$ ) signifikant höhere NO-Konzentrationen auf.



**Abb. 26: IL-6 (A, B) und Stickoxid- (C, D) Konzentrationen im Ileum von mit *T. gondii* infizierten Tieren (Tag 7 post infectionem). t, p<0,06; \*\*, p<0,05 und \*\*\*, p<0,01. (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)**

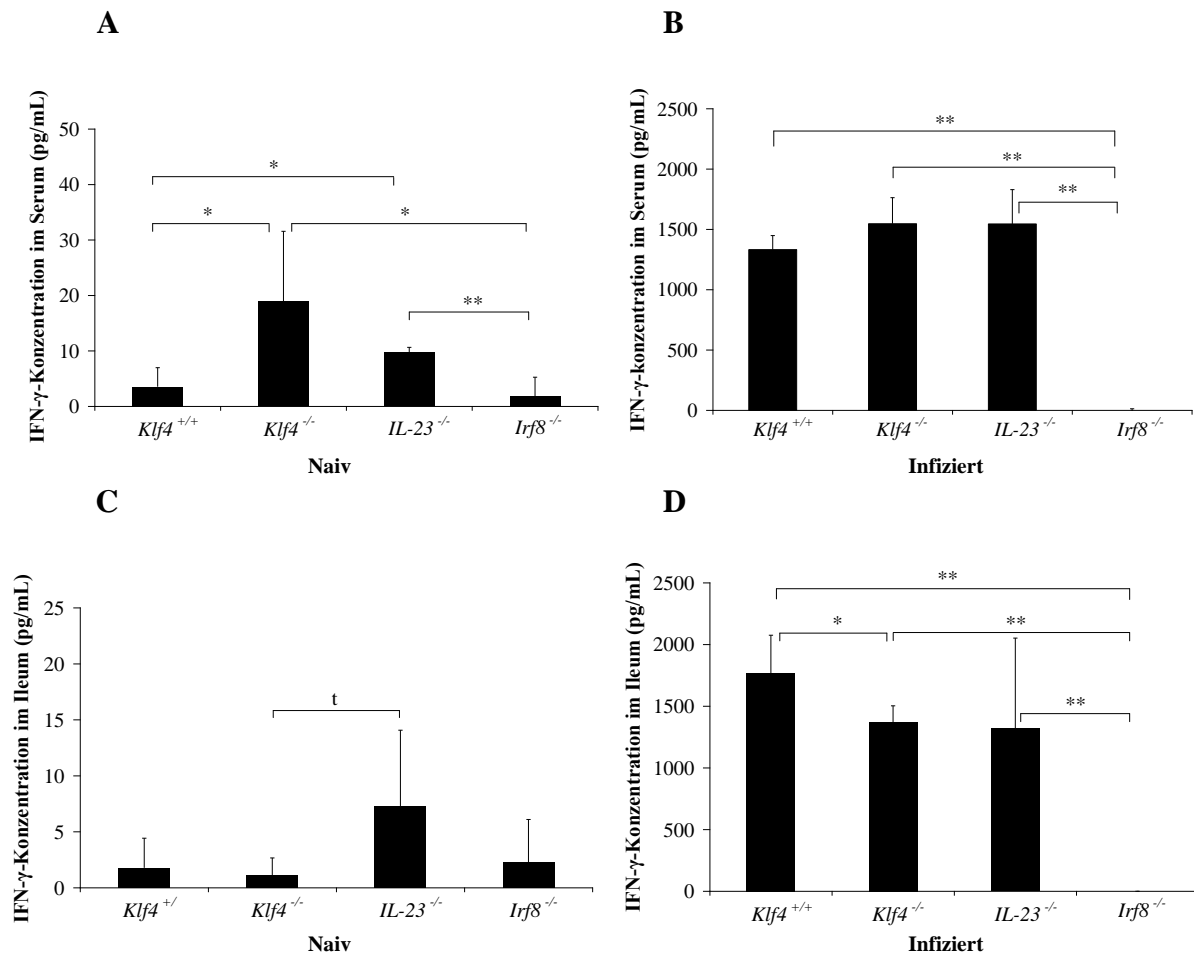
Da sich die IL-6- und NO-Konzentrationen zwischen *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen vor und nach der Infektion sowohl mit 100 Zysten als auch mit 10 Zysten nicht unterscheiden, scheint *Klf4* keine Rolle bei der Produktion von IL-6 und von NO zu spielen. Im Gegensatz dazu ist *Irf8* entscheidend für die konstitutive als auch für die unter der Infektion induzierte IL-6 Produktion.

### 3.2.4.2 IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum und Ileum

Die Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* löste bei *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Zunahme der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im **Serum** im Vergleich zu den naiven Tieren aus (p<0,01), während *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse keinen Unterschied zeigten (Abb. 27A, B). Zwischen infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen fanden sich keine unterschiedlichen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum. Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen signifikante höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Serum als infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf.

*Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen wiesen nach der Infektion signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen als naive Tiere im **Ileum** auf (p<0,01). Infizierte *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen signifikant niedrigere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen als infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse auf (Abb. 27C, D).

Die Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* induzierte bei *Klf4*<sup>+/+</sup>-, *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum und Ileum als unter der Infektion mit 10 Zysten (p<0,01).



**Abb. 27: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum (A und B) und Ileum (C und D) von mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten Tieren (Tag 7 post infectionem). t,  $p < 0,07$ ; \*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ . (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)**

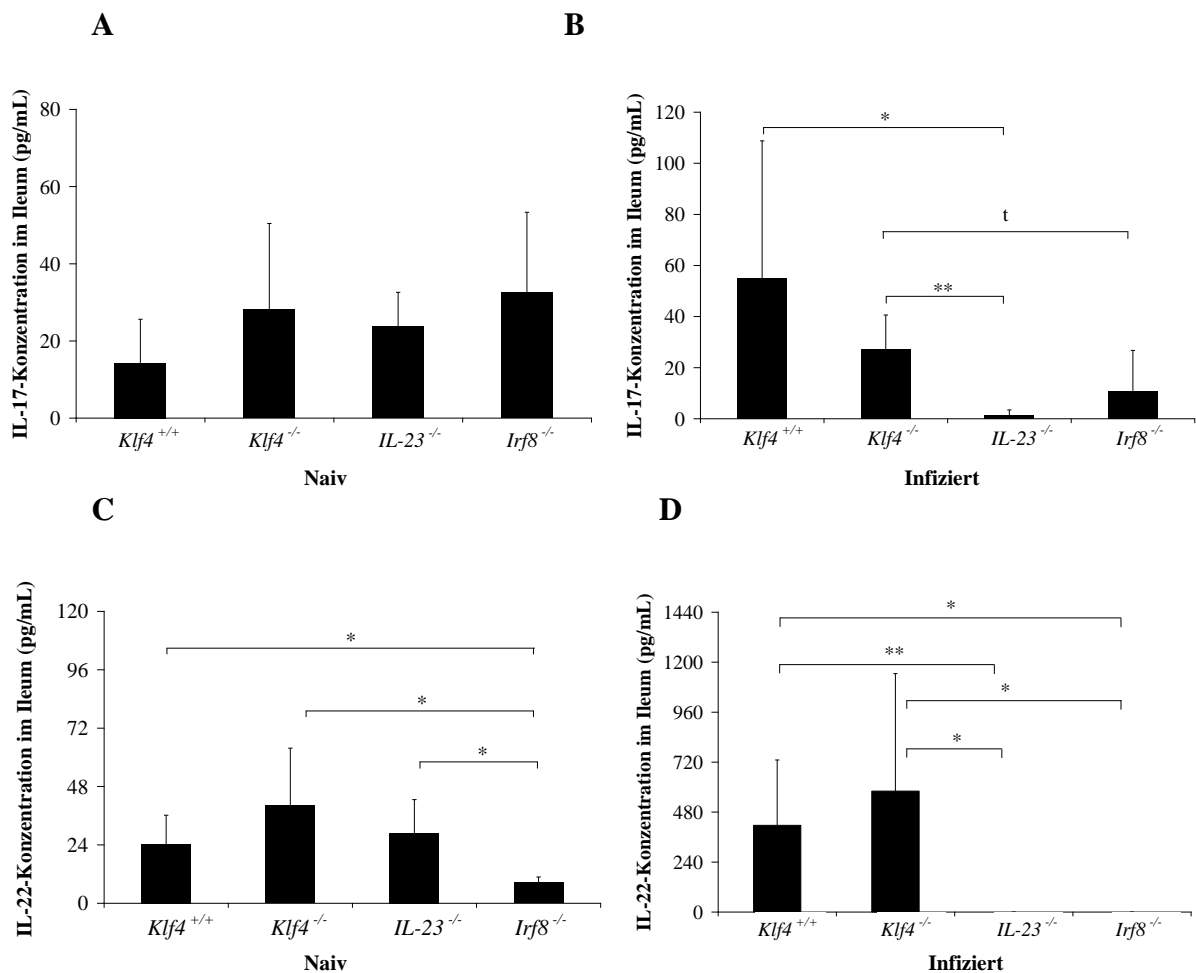
### 3.2.4.3 Konzentrationen von Th17-Zytokinen im Ileum

Die Infektion mit 100 Zysten verursachte keine Veränderung der IL-17-Konzentrationen in *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 28A, B). Zwischen infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten sich keine unterschiedlichen IL-17-Konzentrationen. *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine signifikante Abnahme der IL-17-Konzentrationen im Vergleich zu naiven Tieren ( $p < 0,01$ ), während sich bei *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse kein Unterschied fand. Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen signifikante höhere IL-17-Konzentrationen als *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf.

Die Infektion verursachte eine signifikante Zunahme der IL-22-Konzentrationen bei *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu naiven Tieren ( $p < 0,05$ ) (Abb. 28C, D). Im Gegensatz

dazu zeigten *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu naiven Tieren eine signifikante Abnahme der IL-22-Konzentrationen ( $p < 0,01$ ). Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen vergleichbare IL-22-Konzentrationen auf. IL-22-Konzentrationen waren signifikant höher bei infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- als bei infizierten *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Unter der Infektion mit 100 Zysten wiesen *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant höhere IL-22-Konzentrationen als unter der Infektion mit 10 Zysten ( $p < 0,05$ ). Die Abnahme der IL-22-Sekretion in *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen war unter der Infektion mit 100 Zysten signifikant deutlicher ausgeprägt ( $p < 0,01$ ) als unter der Infektion mit 10 Zysten.



**Abb. 28:** IL-17- (A) und IL-22- (B) Konzentrationen im Ileum von mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten Tieren (Tag 7 post infectionem). t,  $p < 0,07$ ; \*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ . (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)

Die signifikante Abnahme der IL-22-Sekretion in *IL-23*<sup>-/-</sup>- und *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutet an, dass sowohl IL-23 als auch Irf8, jedoch nicht Klf4, für die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-22 unter der Infektion mit 100 Zysten von *T. gondii* verantwortlich sind.

### **3.2.5 Bestimmung der Leukozytensubpopulationen in mesenterialen Lymphknoten und Milz**

#### **3.2.5.1 Bestimmung der IFN- $\gamma$ und IL-17-produzierende CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der mesenterialen Lymphknoten**

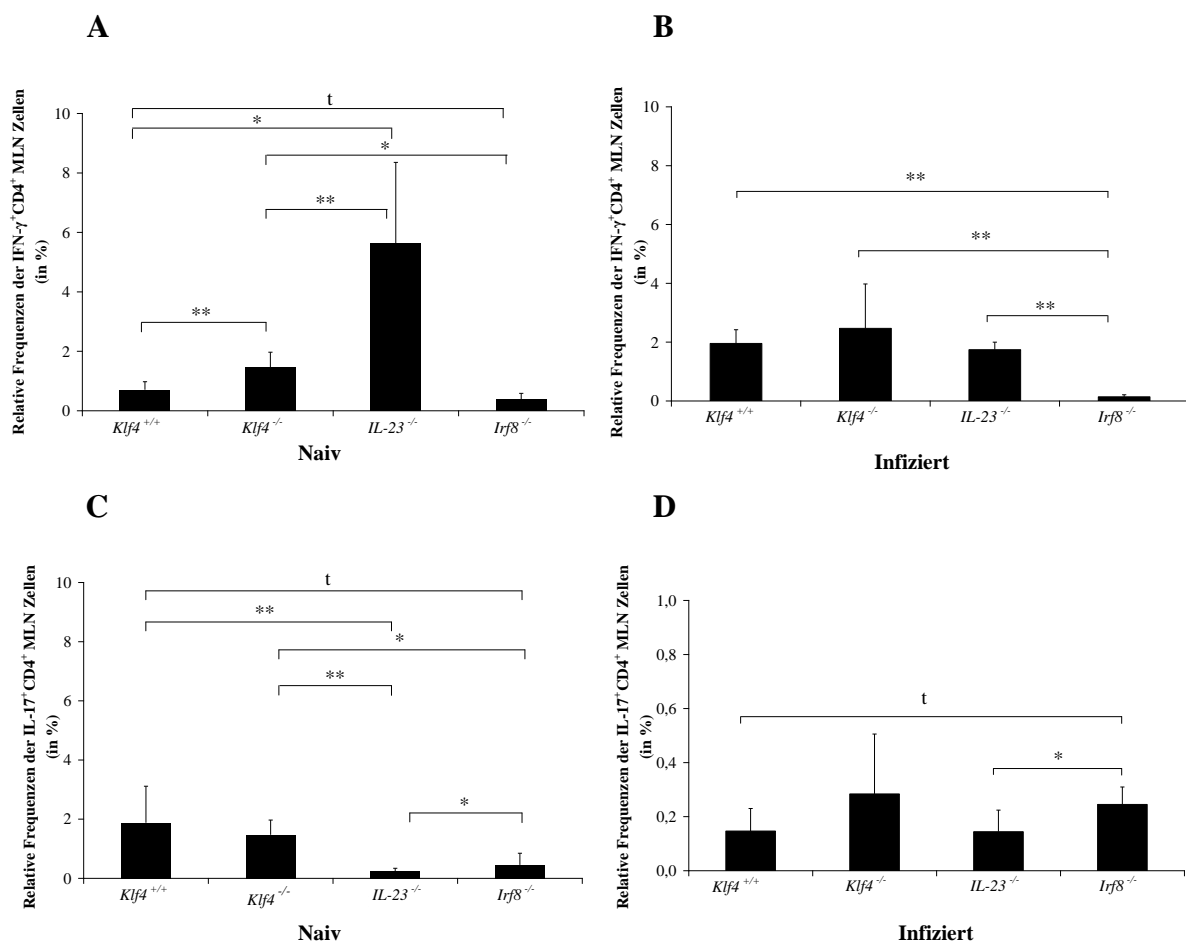
Nach der Infektion zeigten *Klf4*<sup>+/+</sup>- ( $p < 0,01$ ) und *Klf4*<sup>-/-</sup>- ( $p < 0,05$ ) Mäuse signifikant erhöhte Frequenzen an IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen in MLN im Vergleich zu naiven Tieren (Abb. 29A, B). Im Gegenteil dazu zeigten infizierte *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikante Abnahme der Häufigkeit von IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen in MLN ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu naiven Tieren. Zwischen infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäuse bestand keine unterschiedliche Häufigkeit an IFN- $\gamma$  Produzenten. Infizierte *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen jedoch signifikant höhere relative Prozentzahlen an IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen als infizierte *Irf8*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf.

Im Vergleich zur Infektion mit 10 Zysten fanden sich nach der Infektion mit 100 Zysten in MLN von *Klf4*<sup>+/+</sup>- ( $p < 0,05$ ), *Klf4*<sup>-/-</sup>- und *IL-23*<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p < 0,01$ ) signifikant niedrigere Anteile an IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen.

Die Infektion mit 100 Zysten bewirkte darüber hinaus eine Abnahme der Häufigkeit an IL-17 produzierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen in MLN der *Klf4*<sup>+/+</sup>- ( $p < 0,05$ ) und *Klf4*<sup>-/-</sup>- ( $p < 0,01$ ) Mäuse im Vergleich zu naiven Tieren (Abb. 29C, D). Die Häufigkeit von IL-17-Produzenten in CD4<sup>+</sup>-Zellen wies zwischen infizierten *Klf4*<sup>+/+</sup>- und *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine signifikanten Unterschiede

auf. Infizierte  $Klf4^{+/+}$ -Mäuse wiesen tendenziell niedrigere Häufigkeiten an IL-17-Produzenten in  $CD4^+$ -Zellen als  $Irf8^{-/-}$ -Mäuse auf.

Im Vergleich zur Infektion mit 10 Zysten fanden sich in MLN der  $Klf4^{+/+}$ -,  $Klf4^{-/-}$ -,  $IL-23^{-/-}$ - und  $Irf8^{-/-}$ -Mäusen unter der Infektion mit 100 Zysten signifikant niedrigere Frequenzen an IL-17 produzierenden  $CD4^+$ -Zellen ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 29: Durchflusszytometrische Messung der relativen IFN- $\gamma$  (A) und IL-17 (B) Frequenzen an  $CD4^+$ -T-Zellen der MLN von mit *T. gondii* infizierten Tieren (Tag 7 post infectionem). t,  $p < 0,07$ ; \*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ . (Cave: Skalierung bei naiven und infizierten Tiere unterschiedlich)**

In MLN der  $Klf4^{+/+}$ -,  $Klf4^{-/-}$ -,  $IL-23^{-/-}$ - und  $Irf8^{-/-}$ -Mäuse fanden sich unter der Infektion mit 100 Zysten signifikant niedrigere Häufigkeiten an IL-17 produzierenden  $CD4^+$ -Zellen im Vergleich zur Infektion mit 10 Zysten.

## 4. Diskussion

### 4.1 Spielt Klf4 eine Rolle bei der Th1-Immunantwort der Maus nach oraler Infektion mit *T. gondii*?

Da gezeigt wurde, dass Klf4 im hämatopoetischen System sowie bei der Ausschüttung von Zytokinen (IL-1 $\beta$  und IL-6) eine Rolle spielt (persönliche Mitteilung, Dirk Carstanjen, FMP), sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Klf4 auch für die Immunantwort bei Infektionen eine wichtige Rolle spielt. Da Th-1-Immunantworten die Abwehr von intrazellulären Pathogenen vermitteln, wurde die Entwicklung einer Th-1 Immunantwort bei Klf4-defizienten Mäusen untersucht. Hierzu kamen 2 Mausmodelle der Infektion mit dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* zur Anwendung, die sich durch die Generation einer protektiven (oralen Infektion mit 10 Zysten) und pathologischen (oralen Infektion mit 100 Zysten) Th1-Immunantwort unterscheiden.

Nach der oralen Infektion mit *T. gondii* ist die Produktion von IL-12 und die nachfolgende Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK- und T-Zellen im Darm essentiell für die Resistenz gegen den Parasiten [36, 66, 67]. Allerdings ist IFN- $\gamma$  auch das Schlüsselzytokin für die Induktion der durch Ileumnekrosen gekennzeichneten Immunpathologie nach 100 Zysten-Infektion [37]. In der vorliegenden Arbeit ergab sich bei Kontrollmäusen erwartungsgemäß eine Zunahme der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen des Ileums nach der Infektion mit 10 und 100 Zysten [37, 68]. Allerdings waren auch Klf4-defiziente-Mäuse in der Lage, eine lokale Th1-Immunantwort im Ileum zu generieren. Diese Daten weisen darauf hin, dass Klf4 für die Generation einer Th1-Immunantwort im Ileum nicht essentiell ist. Obwohl Klf4-defiziente Mäuse in der Lage waren, IFN- $\gamma$  nach Infektion zu sezernieren (ELISA), fanden sich bei infizierten Klf4-defizienten Mäusen signifikant niedrigere lokale IFN- $\gamma$  Konzentrationen als bei infizierte Kontrollmäusen. Bei Kontrollmäusen, aber auch bei Klf4-defizienten Mäusen, war ebenfalls



eine ausgeprägte systemische Immunantwort mit Erhöhung der Frequenz an CD4<sup>+</sup>-IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-Zellen in MLN nachweisbar. Diese Beobachtung, die bereits von Chardes et al [43] und Liesenfeld et al [39] beschrieben worden war, weist daraufhin, dass Klf4 keine essentielle Bedeutung für die Generierung von lokalen oder systemischen Th1-Immunantworten nach oraler Infektion mit *T. gondii* hat. Weitere Evidenz hierfür ist die Beobachtung, dass die Parasitenzahlen im Darm zwischen Klf4-defizienten Mäusen und Kontrolltieren nicht signifikant unterschiedlich waren und CD4<sup>+</sup>-Zellen und IFN- $\gamma$  die wichtigsten Induktoren der antiparasitären Immunantwort sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Rolle von Klf4 bei Infektionen mit einem parasitären Erregern untersucht. Auch zur Rolle von Klf4 bei der Immunantwort gegen andere Infektionserreger liegen bislang nur sehr wenige Daten vor. Unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von Dr. Dirk Carstanjen (FMP, Berlin Buch) zeigen, dass Mäuse, denen Klf4 im hämatopoetischen System fehlt, nach der Infektion mit *L. monocytogenes* in der Milz eine normale oder sogar erhöhte protektive Th1-Antwort generieren. Darüber hinaus scheint Klf4 die Entzündungsreaktion durch Blockade der TNF- $\alpha$ -Aktivierung und Herunterregulation des „macrophage chemoattractant protein-1“ (MCP-1) in endothelialen Zellen zu hemmen [11, 29]. Im Gegensatz dazu führte die Expression von Klf4 in Mikroglia-Zellen zu einer Induktion von TNF- $\alpha$ , MCP-1 und IL-6 unter LPS-Stimuli [27]. Die Überexpression von Klf4 resultierte auch in der Hemmung von TGF- $\beta$ /Smad3 Funktionen [12, 69, 70], sowie in der Stimulierung der TNF- $\alpha$ , CXCL-5, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) und IL-1 $\alpha$ -Expression im Plattenepithel des Ösophagus [70]. Darüberhinaus konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  Klf4 induzieren kann [12, 69], während über den Einfluss von Klf4 auf die Expression von IFN- $\gamma$  in der Literatur keine Angaben vorliegen. Diese teils kontroversen Ergebnisse lassen keine eindeutige Interpretation des Einflusses von Klf-4 auf die Immunantwort nach Infektionen zu. Unterschiede in den Untersuchungsmodellen, die von in-vitro Versuchen an verschiedenen Zelllinien bis zu

intraperitonealen und oralen Infektionsmodellen reichen, könnten Grund für die beschriebenen konträren Funktionen sein.

Neben IFN- $\gamma$  wurde auch der Einfluß von Klf4 auf die Produktion von NO untersucht, da NO ein weiterer wichtiger antiparasitärer Faktor in der Immunantwort ist. Die Infektion mit 100, nicht aber die mit 10 Zysten *T. gondii* resultierte in einer Zunahme der NO-Sekretion in Ileum der Kontrollmäuse sowie der Klf4-defizienten Mäuse. Es ist bekannt, dass IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  für die Induktion der NO-Produktion verantwortlich sind [68]. Da unter der Infektion mit 100 Zysten mehr IFN- $\gamma$  und TNF ausgeschüttet wird, war zu erwarten, dass die NO-Konzentration höher als unter der Infektion mit 10 Zysten ist. Auch Alder et al. [28] konnten in einer Studie an humanen Makrophagen keine Veränderung der iNOS Expression in der Abwesenheit von Klf4 feststellen. Im Gegensatz dazu führt die Klf4-Überexpression *in vitro* jedoch zur Induktion der iNOS-Expression, was bei Anwesenheit von IFN- $\gamma$  noch verstärkt wurde [12].

Zusammenfassend weisen die hier vorgestellten Daten darauf hin, dass Klf4 eine nur untergeordnete Rolle bei der Generierung einer protektiven als auch pathologischen Th1-Antwort gegen Infektionserreger spielt. Diese Hinweise sind von Bedeutung, da diskutiert wird, Klf4 als Targetmolekül zur Blockade von Immunpathologie bei solchen Erkrankungen einzusetzen, die durch eine überschießende Sekretion Th1-Molekülen wie IFN- $\gamma$  charakterisiert sind. Hypothese dieser Bestrebung ist, dass die Blockade von Klf4 überschüssende Immunreaktionen („Zytokinsturm“) blockieren könnte, ohne dabei gleichzeitig Einfluß auf die Generation von protektiven Th1-Antworten zu nehmen. Bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen sollte dann nicht die Gefahr von Infektionen wie der Reaktivierung der Tuberkulose drohen, wie sie beim Einsatz von TNF-Inhibitoren beschrieben sind [71, 72].

## **4.2 Spielt Klf4 eine Rolle bei der Th17-Immunantwort der Maus nach oraler Infektion mit *T. gondii*?**

In Modellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wurde gezeigt, dass IL-23 eine Zytokinkaskade in Gang setzt, die durch erhöhte Spiegel von IL-6 und IL-17 charakterisiert ist [73]. IL-6 ist an der Induktion inflammatorischer Immunantworten und der Produktion von Antikörpern und Akutphase-Proteinen beteiligt [74] und wurde in letzter Zeit auch als Th17-Zytokin beschrieben [52, 75], weil es mit TGF- $\beta$  an der Differenzierung von naiven T-Zellen in Th17-Zellen beteiligt ist [52, 73, 75, 76]. Die Bedeutung von IL-6 bei der Infektion mit 10 und 100 Zysten *T. gondii* ist bislang nicht im Detail untersucht. Yen et al [52] berichteten, dass IL-6-Konzentrationen bei experimenteller Kolitis in Mäusen unverändert sind, während in anderen Berichten die therapeutische Blockade von IL-6 zur Therapie entzündlicher Darmerkrankungen diskutiert wird [77]. In der vorliegenden Arbeit führte die Infektion mit 10 und 100 Zysten *T. gondii* nicht zu einer Erhöhung der IL-6-Konzentration im Ileum von Kontrollmäusen.

Auch wiesen IL-6-Konzentrationen in Klf4-defizienten Mäusen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Klf4 nicht die Produktion von IL-6 kontrolliert. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (D. Carstanjen, persönliche Mitteilung) zeigen jedoch, dass Klf4 in myeloischen Zellen die Expression verschiedener Gene induziert, die die Induktion von Th17-Zellen beeinflussen, darunter IL-6 [78, 79] und IL-1 $\beta$  [80]. Diese gegenteiligen Ergebnisse lassen sich am ehesten dadurch erklären, dass in der vorliegenden Arbeit die Konzentration von IL-6 nur in Biopaten des Ileums, nicht aber in spezifischen Zellpopulationen untersucht wurde.

Das hauptsächlich von CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen sezernierte IL-17 [36] wird bislang als wichtiger Faktor für die Induktion einer Immunpathologie angesehen [52, 73, 81]. Es wirkt sowohl auf

Immun- als auch auf Nicht-Immunzellen und ist im Darmgewebe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht [53, 73, 81]. Da die IL-17/IL-17-Rezeptor Signalkaskade einen Einfluss auf die Reifung, Migration und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten hat, wurde dieser Signalkaskade auch eine Rolle in der Resistenz gegen extrazelluläre Erreger wie *Klebsiella pneumoniae* zugeschrieben [14, 82, 83].

Im Fall der oralen Infektion mit *T. gondii* wurde ebenfalls eine IL-17R-vermittelte Granulozytenmigration als essentiell für die Abwehr der Infektion postuliert: Interessanterweise waren IL-17R-defizienten Mäuse weniger suszeptibel für die Entwicklung der Darmpathologie im Vergleich zu Kontrollmäusen und wiesen erwartungsgemäß einen Defekt in der Neutrophilen-Rekrutierung ins Ileum und in die Peritonealhöhle, sowie eine erhöhte Mortalität auf [84]. Nach 10 und 100 Zysten Infektionen wurden in der vorliegenden Arbeit keine gesteigerte IL-17-Sekretion im Ileum nachgewiesen. Munoz et al. [48] beobachteten sogar eine Reduktion der IL-17-Konzentration nach der Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*, was auf eine nicht essentielle Rolle dieses Zytokins hindeutet. Da auch zwischen Klf4-defizienten- und Kontrollmäusen keine Unterschiede in den IL-17-Konzentrationen zu beobachten waren, deuten die hier erhobenen Daten nicht auf eine essentielle Bedeutung von Klf4 auf die IL-17-Sekretion oder Generierung einer Th-17 Antwort hin.

Neben IL-17 produzieren Th17-Zellen auch IL-22, ein Mitglied der IL-10 Familie [48, 56]. Obwohl es von verschiedenen Immunzellpopulation produziert wird, hat IL-22 keine Wirkung auf Immunzellen *in vivo* oder *in vitro*, sondern regelt die Funktionen von IL-22-Rezeptor-tragenden Gewebezellen wie Epithelzellen [48, 85]. Interessanterweise wurde IL-22 sowohl als protektives als auch als pathogenisches Zytokin in Entzündungsmodellen beschrieben. So vermittelt IL-22 Hautveränderungen, wie sie bei der Psoriasis beobachtet werden [48, 85-87]. Im Gegensatz dazu spielt IL-22 eine protektive Rolle in experimentellen Modellen von Kolitis

[48, 57-60], unter der Infektion der Lunge mit *Klebsiela pneumoniae* [48, 88] sowie bei der Leberschädigung durch Concanavalin A [48, 89, 90]. Zwischen Klf4-defizienten- und Kontrollmäusen zeigten sich in den hier erhobenen Daten keine Unterschiede in den IL-22-Konzentrationen. Nach der Infektion mit 100 Zysten, jedoch nicht nach der Infektion mit 10 Zysten, ist eine Zunahme der IL-22-Konzentrationen zu sehen. Munoz et al. [48] zeigten, dass die pathogene Rolle des IL-23 in der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* durch IL-22, nicht aber durch IL-17 vermittelt wird. In Übereinstimmung mit unseren Daten (Infektion mit 100 Zysten) finden sich erhöhte IL-22-Konzentrationen, während die IL-17-Produktion im Ileum von *T. gondii*-infizierten Mäusen herunterreguliert ist [48]. Diese Daten weisen daraufhin, dass Klf4 für die Generierung von IL-22 nicht wichtig ist.

#### **4.3 Welche Bedeutung hat Klf4 für die Reifung spezifischer Zellpopulationen nach oraler Infektion mit *T. gondii*?**

Makrophagen/Monozyten stellen eine wichtige Zellpopulationen bei der Abwehr intrazellulärer Erreger dar [44, 46]. Neben plasmazytoiden (CD11c+CD11b-) und Myeloiden DCs (CD11c+CD11b+) sind auch sog. inflammatorischen Monozyten (CD11b+Ly-6C+Ly-6G-) beschrieben worden, die die Entzündungsreaktion durch die Produktion von IL-12, TNF- $\alpha$  und NOS vermitteln [44, 46]. Mordue et al. [91] zeigten, dass inflammatorische Monozyten das Wachstum von *T. gondii* durch die NO-Produktion in vitro hemmen können. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit in vivo keine erhöhte Zahl an Parasiten im Gewebe nachgewiesen werden, obwohl die Zahl der inflammatorischen Monozyten reduziert war. Zukünftige Arbeiten werden zeigen müssen, ob es sich hierbei um eine unterschiedliche Rolle in vitro und in vivo handelt oder ob andere Gründe für die Diskrepanzen verantwortlich sind.

Klf4 beeinflusst die Aktivierung von Makrophagen, weil Klf4-überexprimierende Zellen Gene wie iNOS induzieren [12]. Dazu kommt, dass unter IFN- $\gamma$ -Einfluß die Klf4-abhängige iNOS-Induktion deutlich erhöht ist [12]. Andererseits berichteten Alder et al. [28], dass Klf4 für diese Aktivierung nicht benötigt wird, wohl aber für die Differenzierung und das Überleben der inflammatorischen Monozyten wichtig ist [28]. Diese Daten stimmen mit denen der vorliegenden Arbeit überein, da Klf4-defiziente Mäuse sowohl vor als auch nach der Infektion im Vergleich zu *Klf4*<sup>+/+</sup>-Mäusen geringere Ly-6C<sup>+</sup>-Monozytenanteile hatten.

Dendritische Zellen (DC) sind wichtige antigenpräsentierende-Zellen (APC), die die Differenzierung von T-Zellen nach Infektionen steuern [36, 40]. Unterschiedliche DC-Population (plasmazytoide für Th1 und myeloide/klassische für Th2 [92-94]) polarisieren spezialisierte Immunantworten, die von mikrobiellen Antigenen und dem Zytokinmuster bei Aktivierung der DCs abhängig sind [92, 93]. *T. gondii* ist in der Lage humane und murine DCs zu infizieren [36], und nutzt sowohl die funktionelle Plastizität als auch die migratorischen Fähigkeiten der DCs (meist CD11c<sup>+</sup>) für seine Verbreitung im Körper [36, 40, 95]. In Übereinstimmung mit der Literatur, die zeigt, dass phagozytierende Zellen an den Ort der Infektion einwandern [96-98], ist in unserer Arbeit die Frequenz der Monozyten, der plasmazytoiden DCs (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>) sowie der myeloiden DCs (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) unter der protektiven Immunantwort in MLN erhöht. Vor und nach der Infektion zeigen Klf4-defiziente Mäuse jedoch geringere Frequenzen an Monozyten als Kontrollmäuse, wie in der Literatur beschrieben [28]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass die beobachtete Reduktion der Monozytenzahlen in den Klf4-defizienten Mäusen keine signifikanten Auswirkungen auf den Verlauf der Infektion hat. Weder Marker der Entzündungsreaktion noch Parasitenzahlen waren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unter der Infektion unverändert. Zukünftige Arbeiten in verschiedenen Entzündungsmodellen werden so zeigen müssen, ob sich Klf4 als Target für die Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder anderen durch Immunpathologie charakterisierten Erkrankungen

eignet [17]. Diese Untersuchungen werden auch im Detail den Einfluß einer Blockade von Klf4 auf unterschiedliche Zellpopulationen zeigen müssen.

Ein weiteres interessantes Ergebnis der vorliegenden Arbeit war die verminderte Becherzellzahl in naiven *Klf4*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Vermehrte Zahlen an Becherzellen sind charakteristischerweise bei Helmintheninfektionen zu finden [99]. Wir vermuten, dass eine VavCre getriebene Deletion von Klf4 in Becherzellen aufgetreten ist. Ein ähnlicher Phenotyp ist von Shields et al. [5] bei einer konditionellen Deletion von Klf4 in Darmepithelzellen beschrieben worden. Die Becherzellen in diesen Klf4-defizienten Mäusen sind als unreife Zellen beschrieben, die eine gestörte Reifung aufweisen [7]. Der Fehler ist im Kolon ausgeprägt und nur minimal im Dünndarm nachweisbar [5, 7]. Die erhöhte Zahl an Becherzellen in den Mäusen mit Deletionen an Th1/Th17-Genen wie *IRF-8* und *IL-23* ist nicht unerwartet und als reflektorische Th2-Antwort zu interpretieren.

## 5. Zusammenfassung

Krüppel-like-Faktoren (Klfs) sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine bedeutende Rolle in der Zellvermehrung und Kontrolle der Differenzierung haben. Zudem scheinen Klfs auch eine Rolle bei der Entwicklung von entzündlichen Erkrankungen zu spielen. Klf4 ist an der Hemmung der Zellproliferation und der Differenzierung und Regulierung des Wachstums des Darms sowie der Haut beteiligt. Im Immunsystem interagiert Klf4 mit IFN- $\gamma$  und kann die T-Zell-Wanderung und das Homing von T-Zellen regulieren. Es ist aber noch unklar, ob Klf4 in der Entwicklung von Autoimmun- und Infektionskrankheiten eine Rolle spielt. Deswegen wurde in dieser Arbeit die Rolle von Klf4 bei der oralen Infektion mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii* untersucht. Dazu wurden in-vivo und ex-vivo Versuche an Klf4-Wildtyp- und Knockout-Mäusen durchgeführt, in denen eine protektive (10 Zysten) sowie eine pathologische (100 Zysten) Immunantwort induziert wurde.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Klf4 weder für die Generierung einer protektiven noch für die Generierung einer pathologischen Th1-Immunantwort essentiell ist, da sich der Verlauf der Infektion und die Th1- und Th17-Zytokinkonzentrationen nicht zwischen Klf4-Wildtyp- und Klf4-Knockout-Mäusen unterscheiden. Klf4VavCre Mäuse zeigen jedoch generell geringere Frequenzen an Monozyten als Kontrollmäuse. Unsere Arbeit bestätigt auch die Ergebnisse von anderen Autoren, die Klf4 eine Rolle bei der Differenzierung und dem Überleben der inflammatorischen Monozyten zuschreiben, da die Klf4-defizienten Mäuse geringere Ly-6C<sup>+</sup>-Monozytenfrequenzen im Vergleich zu Kontrollmäusen aufwiesen.

Limitationen der Studie sind die limitierte Zahl an Versuchstieren, die eine solide statistisch abgesicherte Schlussfolgerung nicht in allen in-vivo Versuchen erlaubten. Auch sind die angewandten Infektionsmodelle nur dazu ausgelegt, die akute Phase der Infektion zu untersuchen, nicht aber die chronische Phase, die bei Patientin lebenslang symptomlos verläuft.



Zusammenfassend tragen die hier erhobenen Ergebnisse zum Verständnis der Bedeutung von Klf4 bei Infektionen bei, und erweitern ebenfalls das Verständnis der Immunpathogenese der Infektion mit *T. gondii*.

## 6. Summary

Krüppel-like factors (Klfs) compose a family of transcription factors that play an important role in cell proliferation and are also able to control cell differentiation. In addition, Klfs are involved in the development of inflammatory diseases. Studies have shown that Klf4 inhibits cell proliferation and regulate cell growth in the intestine and the skin. Klf4 interacts with IFN- $\gamma$  and regulates T cell migration and homing into tissues. However, the role of Klf4 in the development of autoimmune and infectious diseases is not well understood. Therefore, the present study investigates the role of Klf4 during the development of small intestinal immunopathology using a well characterized Th1 murine model of inflammation after *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infection. Ex vivo and in vivo experiments using Klf4 wildtype and deficient mice were performed after the induction of a protective (10 cysts infection) or a pathogenic (100 cysts infection) immune response against the parasite.

Here we show that Klf4 is dispensable for the generation of protective or pathogenic Th1 immune responses. After *T. gondii* infection, Th1 and Th17 cytokine concentration was similar between wildtype and Klf4 deficient mice. However, Klf4 deficient mice harbored fewer monocytes, particularly a lower percentage of Ly6C<sup>+</sup> cells were found in mINs, organs compared to the wildtype mice. Therefore, we observed what others have previously shown, that Klf4 plays an important role in the differentiation and survival of inflammatory monocytes.

Limitations of the study include a limited number of animals used in all in vivo experiments that does not allow to statistically confirm our results. Furthermore, our infection models are only designed to investigate the acute but not the chronic phase of infection, the lifelong phase in infected patients without symptoms. In summary, the results of this study contribute

to the understanding of the role of Klf4 in infections, and specifically the understanding of the immunopathogenesis of *T. gondii* infections.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Bureau, C., et al., *Expression and Function of Kruppel Like-Factors (KLF) in Carcinogenesis*. Curr Genomics, 2009. **10**(5): p. 353-60.
2. Perkins, A.C., A.H. Sharpe, and S.H. Orkin, *Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF*. Nature, 1995. **375**(6529): p. 318-22.
3. Nuez, B., et al., *Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene*. Nature, 1995. **375**(6529): p. 316-8.
4. Wani, M.A., S.E. Wert, and J.B. Lingrel, *Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21180-5.
5. Shields, J.M., R.J. Christy, and V.W. Yang, *Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 20009-17.
6. Nandan, M.O. and V.W. Yang, *The role of Kruppel-like factors in the reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells*. Histol Histopathol, 2009. **24**(10): p. 1343-55.
7. McConnell, B.B., et al., *The diverse functions of Kruppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology*. Bioessays, 2007. **29**(6): p. 549-57.
8. Ghaleb, A.M., et al., *Kruppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation*. Cell Res, 2005. **15**(2): p. 92-6.
9. Black, A.R., J.D. Black, and J. Azizkhan-Clifford, *Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer*. J Cell Physiol, 2001. **188**(2): p. 143-60.
10. Ghaleb, A.M. and V.W. Yang, *The Pathobiology of Kruppel-like Factors in Colorectal Cancer*. Curr Colorectal Cancer Rep, 2008. **4**(2): p. 59-64.
11. Hamik, A., et al., *Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13769-79.
12. Feinberg, M.W., et al., *Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38247-58.
13. Yamada, T., et al., *Transcription factor ELF4 controls the proliferation and homing of CD8+ T cells via the Kruppel-like factors KLF4 and KLF2*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 618-26.
14. Gaddi, P.J. and G.S. Yap, *Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(2): p. 155-9.
15. Kaczynski, J., T. Cook, and R. Urrutia, *Sp1- and Kruppel-like transcription factors*. Genome Biol, 2003. **4**(2): p. 206.
16. Wei, G., et al., *Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 155-67.
17. Yoshida, T., K.H. Kaestner, and G.K. Owens, *Conditional deletion of Kruppel-like factor 4 delays downregulation of smooth muscle cell differentiation markers but accelerates neointimal formation following vascular injury*. Circ Res, 2008. **102**(12): p. 1548-57.
18. Atkins, G.B. and M.K. Jain, *Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology*. Circ Res, 2007. **100**(12): p. 1686-95.
19. Feinberg, M.W., et al., *An emerging role for Kruppel-like factors in vascular biology*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(6): p. 241-6.

20. Lomberk, G. and R. Urrutia, *The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 1): p. 1-11.
21. Banerjee, S.S., et al., *The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2581-4.
22. Kanazawa, A., et al., *Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding Kruppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes*. Diabetologia, 2005. **48**(7): p. 1315-22.
23. Garrett-Sinha, L.A., et al., *A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31384-90.
24. Tetreault, M.P., et al., *Esophageal squamous cell dysplasia and delayed differentiation with deletion of kruppel-like factor 4 in murine esophagus*. Gastroenterology. **139**(1): p. 171-81 e9.
25. Chen, X., et al., *Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30423-8.
26. Evans, P.M. and C. Liu, *Roles of Krupel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(7): p. 554-64.
27. Kaushik, D.K., et al., *Kruppel-like factor 4, a novel transcription factor regulates microglial activation and subsequent neuroinflammation*. J Neuroinflammation. **7**: p. 68.
28. Alder, J.K., et al., *Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5645-52.
29. Shen, B., et al., *Kruppel-like factor 4 is a novel mediator of Kallistatin in inhibiting endothelial inflammation via increased endothelial nitric-oxide synthase expression*. J Biol Chem, 2009. **284**(51): p. 35471-8.
30. J. P. Dubey, C.P.B., *Toxoplasmosis of Animals and Man*. 1988: CRC Press.
31. Aliberti, J., *Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by Toxoplasma gondii*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(2): p. 162-70.
32. Denkers, E.Y. and R.T. Gazzinelli, *Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(4): p. 569-88.
33. Montoya, J.G. and O. Liesenfeld, *Toxoplasmosis*. Lancet, 2004. **363**(9425): p. 1965-76.
34. Pappas, G., N. Roussos, and M.E. Falagas, *Toxoplasmosis snapshots: Global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. Int J Parasitol, 2009.
35. Hill, D. and J.P. Dubey, *Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention*. Clin Microbiol Infect, 2002. **8**(10): p. 634-40.
36. Buzoni-Gatel, D., et al., *Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on Toxoplasma gondii infections*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 535-44.
37. Liesenfeld, O., et al., *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, 1996. **184**(2): p. 597-607.
38. Liesenfeld, O., *Oral infection of C57BL/6 mice with Toxoplasma gondii: a new model of inflammatory bowel disease?* J Infect Dis, 2002. **185 Suppl 1**: p. S96-101.
39. Liesenfeld, O., *Immune responses to Toxoplasma gondii in the gut*. Immunobiology, 1999. **201**(2): p. 229-39.

40. Kasper, L., et al., *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol*, 2004. **34**(3): p. 401-9.
41. Munoz, M., O. Liesenfeld, and M.M. Heimesaat, *Immunology of Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev*. **240**(1): p. 269-85.
42. Ferreira da Silva Mda, F., et al., *Stress-related and spontaneous stage differentiation of Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst*, 2008. **4**(8): p. 824-34.
43. Chardes, T., et al., *Mucosal and systemic cellular immune responses induced by Toxoplasma gondii antigens in cyst orally infected mice*. *Immunology*, 1993. **78**(3): p. 421-9.
44. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
45. Bliss, S.K., et al., *Neutrophil depletion during Toxoplasma gondii infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology*. *Infect Immun*, 2001. **69**(8): p. 4898-905.
46. Dunay, I.R. and L.D. Sibley, *Monocytes mediate mucosal immunity to Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol*. **22**(4): p. 461-6.
47. Dunay, I.R., A. Fuchs, and L.D. Sibley, *Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with Toxoplasma gondii in mice*. *Infect Immun*. **78**(4): p. 1564-70.
48. Munoz, M., et al., *Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17*. *J Exp Med*, 2009. **206**(13): p. 3047-59.
49. Vossenkamper, A., et al., *Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with Toxoplasma gondii, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(11): p. 3197-207.
50. Liesenfeld, O., et al., *Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with Toxoplasma gondii tissue cysts*. *J Parasitol*, 2001. **87**(6): p. 1491-3.
51. Heimesaat, M.M., et al., *Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 2006. **177**(12): p. 8785-95.
52. Yen, D., et al., *IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(5): p. 1310-6.
53. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2003. **52**(1): p. 65-70.
54. Nielsen, O.H., et al., *Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2003. **38**(2): p. 180-5.
55. Kleinschek, M.A., et al., *Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation*. *J Exp Med*, 2009. **206**(3): p. 525-34.
56. Dumoutier, L., J. Louahed, and J.C. Renauld, *Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9*. *J Immunol*, 2000. **164**(4): p. 1814-9.
57. Sugimoto, K., et al., *IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(2): p. 534-44.
58. Satoh-Takayama, N., et al., *Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense*. *Immunity*, 2008. **29**(6): p. 958-70.
59. Zenewicz, L.A., et al., *Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease*. *Immunity*, 2008. **29**(6): p. 947-57.
60. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. *Nat Med*, 2008. **14**(3): p. 282-9.

61. Katz, J.P., et al., *The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon*. Development, 2002. **129**(11): p. 2619-28.
62. Ogilvy, S., et al., *Transcriptional regulation of vav, a gene expressed throughout the hematopoietic compartment*. Blood, 1998. **91**(2): p. 419-30.
63. Georgiades, P., et al., *VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages*. Genesis, 2002. **34**(4): p. 251-6.
64. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
65. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
66. Suzuki, Y., et al., *Interferon-gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii*. Science, 1988. **240**(4851): p. 516-8.
67. Scharton-Kersten, T.M., et al., *In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to Toxoplasma gondii while failing to control acute infection*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 4045-54.
68. Liesenfeld, O., et al., *TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol, 1999. **21**(7): p. 365-76.
69. Chen, Z.Y., J. Shie, and C. Tseng, *Up-regulation of gut-enriched kruppel-like factor by interferon-gamma in human colon carcinoma cells*. FEBS Lett, 2000. **477**(1-2): p. 67-72.
70. Tetreault, M.P., et al., *Klf4 Overexpression Activates Epithelial Cytokines and Inflammation-Mediated Esophageal Squamous Cell Cancer in Mice*. Gastroenterology.
71. Colombel, J.F., et al., *Adalimumab safety in global clinical trials of patients with Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(9): p. 1308-19.
72. Toruner, M., et al., *Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2008. **134**(4): p. 929-36.
73. McGovern, D. and F. Powrie, *The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD*. Gut, 2007. **56**(10): p. 1333-6.
74. Matowicka-Karna, J., V. Dymicka-Piekarska, and H. Kemona, *Does Toxoplasma gondii infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha)?* Clin Dev Immunol, 2009. **2009**: p. 374696.
75. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
76. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
77. Mudter, J. and M.F. Neurath, *Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications*. Gut, 2007. **56**(2): p. 293-303.
78. Korn, T., et al., *IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18460-5.
79. Ogura, H., et al., *Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 628-36.
80. Sutton, C., et al., *A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1685-91.
81. Sarra, M., et al., *IL-23/IL-17 axis in IBD*. Inflamm Bowel Dis. **16**(10): p. 1808-13.

82. Happel, K.I., et al., *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 761-9.
83. Happel, K.I., et al., *Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4432-6.
84. Kelly, M.N., et al., *Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 617-21.
85. Wolk, K., et al., *IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not*. J Mol Med, 2009. **87**(5): p. 523-36.
86. Ma, H.L., et al., *IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 597-607.
87. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 648-51.
88. Aujla, S.J., P.J. Dubin, and J.K. Kolls, *Interleukin-17 in pulmonary host defense*. Exp Lung Res, 2007. **33**(10): p. 507-18.
89. Radaeva, S., et al., *Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1332-42.
90. Zenewicz, L.A., et al., *Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 647-59.
91. Mordue, D.G. and L.D. Sibley, *A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(6): p. 1015-25.
92. Boonstra, A., et al., *Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 101-9.
93. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
94. Facchetti, F., et al., *The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells*. Virchows Arch, 2003. **443**(6): p. 703-17.
95. Tait, E.D. and C.A. Hunter, *Advances in understanding immunity to Toxoplasma gondii*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(2): p. 201-10.
96. Denkers, E.Y., et al., *Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma*. Int J Parasitol, 2004. **34**(3): p. 411-21.
97. Channon, J.Y., R.M. Seguin, and L.H. Kasper, *Differential infectivity and division of Toxoplasma gondii in human peripheral blood leukocytes*. Infect Immun, 2000. **68**(8): p. 4822-6.
98. Bennouna, S., et al., *Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6052-8.
99. Liesenfeld, O., I.R. Dunay, and K.J. Erb, *Infection with Toxoplasma gondii reduces established and developing Th2 responses induced by Nippostrongylus brasiliensis infection*. Infect Immun, 2004. **72**(7): p. 3812-22.



## 8. Anhang

### 8.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

#### 8.1.1 Abbildungsverzeichnisse

Abb. 1: <i>T. gondii</i> Lebenszyklus.....	16
Abb. 2 Mukosale Immunantwort gegen <i>T. gondii</i> .....	17
Abb. 3: Überschießende Th1-Immunantwort gegen <i>T. gondii</i> .....	20
Abb. 4: Gewichtsverlauf (prozentual) nach oraler Infektion mit 10 Zysten <i>T. gondii</i> der <i>Klf4</i> <sup>+/+</sup> -, <i>Klf4</i> <sup>-/-</sup> -, <i>IL-23</i> <sup>-/-</sup> - und <i>Irf8</i> <sup>-/-</sup> - Mäuse im Vergleich zum Tag 0.....	50
Abb. 5: H&E-gefärbte Ileumschnitte von naiven (A bis D) und mit 10 Zysten <i>T. gondii</i> infizierten Mäusen (E bis H) (10x Vergrößerung).....	51
Abb. 6: Becherzellzahl im distalen Ileum von naiven (A) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (B, Tag 9 post infectionem).....	52
Abb. 7: Histopathologischer „Score“ der Darmpathologie an Tag 9 nach oraler Infektion mit 10 Zysten <i>T. gondii</i> ME49.....	52
Abb. 8: H&E-Färbung der Leber der naiven (oben) und mit 10 Zysten infizierten Tiere (unten).....	53
Abb. 9: Anzahl der Entzündungsareale in der Leber von Mäuse 9 Tage nach oralen Infektion mit 10 Zysten <i>T. gondii</i> (100x Vergrößerung).....	53
Abb. 10: Parasitenlast in je 1 cm des distalen Ileums von Mäusen 9 Tage nach oralen Infektion mit 10 Zysten <i>T. gondii</i> .....	54
Abb. 11: IL-6 (A, B) und Stickoxid- (C, D) Konzentrationen im Ileum von naiven (A, C) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post	

infectionem).....	56
Abb. 12: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum (A, B) und Ileum (C, D) von naiven (A, C) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem)...	57
Abb. 13: IL-17- (A, C) und IL-22- (B, D) Konzentrationen im Ileum von naiven (A, C) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tiere (B, D; Tag 9 post infectionem).....	58
Abb. 14: Durchflusszytometrische Messung der relativen IFN- $\gamma$ Frequenzen an CD4 <sup>+</sup> - (A, B) und CD8 <sup>+</sup> - (C, D) T-Zellen der MLN von naiven (A, C) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tiere (B, D; Tag 9 post infectionem)...	60
Abb. 15: Durchflusszytometrische Messung der relativen IL-17 Frequenzen an CD4 <sup>+</sup> - (A, B) und CD8 <sup>+</sup> - (C, D) T-Zellen der MLN von naiven (A, C) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem).....	62
Abb. 16: Durchflusszytometrische Messung der relativen CD3 <sup>+</sup> (A, B) und B220 <sup>+</sup> (C, D) Frequenzen an Zellen der MLN von naiven (A, C) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem).....	63
Abb. 17: Durchflusszytometrische Messung der relativen Granulozyten (A, B) und Monozyten (C, D) Frequenzen der MLN von naiven (A, C) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem).....	65
Abb. 18: Durchflusszytometrische Messung der relativen CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> (A, B) und CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> (C, D) Zellen der MLN von naiven (A, C) und mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (B, D; Tag 9 post infectionem).....	68
Abb. 19: Gewichtsverlauf der <i>Klf4</i> <sup>+/+</sup> -, <i>Klf4</i> <sup>-/-</sup> -, <i>IL-23</i> <sup>-/-</sup> - und <i>Irf8</i> <sup>-/-</sup> - Mäuse nach oraler Infektion mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> .....	70
Abb. 20: H&E-gefärbte Ileumschnitte von naiven (A bis D) und mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> infizierten Mäusen (E bis H) (10x Vergrößerung).....	71
Abb. 21: Becherzellzahl in distalem Ileum von naiven (A) und mit <i>T. gondii</i>	

infizierten Tieren (B, Tag 7 post infectionem).....	71
Abb. 22: Histopathologischer „Score“ der Darmpathologie an Tag 7 nach oraler Infektion mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> .....	72
Abb. 23: H&E-gefärbte Leberschnitte von naiven (A bis D) und mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> infizierten Mäusen (E bis H) (10x Vergrößerung).....	72
Abb. 24: Anzahl der Entzündungsarealen in der Leber von Mäuse 7 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> (bei 100-facher Vergrößerung).....	73
Abb. 25: Parasitenlast in je 1 cm des distalen Ileums von Mäusen 7 Tage nach oralen Infektion mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> .....	74
Abb. 26: IL-6 (A, B) und Stickoxid- (C,D) Konzentrationen im Ileum von mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (Tag 7 post infectionem).....	76
Abb. 27: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Serum (A und B) und Ileum (C und D) von mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (Tag 7 post infectionem)...	77
Abb. 28: IL-17- (A) und IL-22- (B) Konzentrationen im Ileum von mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (Tag 7 post infectionem).....	78
Abb. 29: Durchflusszytometrische Messung der relativen IFN- $\gamma$ (A) und IL-17 (B) Frequenzen an CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen der MLN von mit <i>T. gondii</i> infizierten Tieren (Tag 7 post infectionem).....	80
 <b>8.1.2 Tabellenverzeichnisse</b>	
Tab. 1: Die Funktionsmerkmale der KLF-Familie.....	13
Tab. 2: Die Bedeutung von KLF4 im Immunsystem.....	15
Tab. 3: Histologische Kriterien der Schwere der pathologischen Veränderungen im Darm.....	40

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

### Kürzel - Bezeichnung

°C - Grad Celsius

µl - Mikroliter

µm - Mikrometer

µM - Mikromolar

A - Adenosin

Abb. - Abbildung

AG - Arbeitsgruppe

AK - Antikörper

Anti-Fcγ - Antikörper gegen den Fcγ-Rezeptor

APC - (engl.) Antigen presenting cell

ATP - Adenosintriphosphat

BCG - Bacillus Calmette-Guerin

BMD-DC - (engl.) Bone marrow Derived- DC

bp - bindendes Protein

BSA - Bovines Serum Albumin

bzw. - beziehungsweise

C - Cytosin

CD - (engl.) Cluster of Differentiation

CD40L - CD40-Ligand

cDNA - (engl.) cyclic DNA

CED - Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

CIA - (engl.) Collagen-Induced Arthritis

cm - Zentimeter

Cp - (engl.) Crossing point

DC - (engl.) Dendritic Cell

DNA - Desoxiribonukleinsäure

DNTP - Nucleotidtriphosphat

DSS - Dextransodiumsulfat

DTT - Dithiotreitol

EAE - (engl.) Experimental Autoimmune Encephalitis

EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA - (engl.) Enzyme-linked Immunosorbent Assay

eNOS - (engl.) Endothelial nitric oxide synthase (Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase)

ER - Endoplasmatisches Retikulum

et al. - (lat..) 'et alii', 'und andere'

FACS - (engl.) Fluorescence Activated Cell Sorting -Durchflußzytometrie

FCS - (engl.) Fetal Calf Serum

FEM - Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin

FGFs - (engl.) Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

FITC - Fluoreszeinisothiocyanat

FL - Fluoreszein

g - Erdbeschleunigung

g - Guanosin

G-CSF - (engl.) Granulocyte Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)

H&E - Hämatoxolin & Eosin

HIV - Humanes Immundefizienz Virus

HP - (engl.) Hybridisation Probes

HPRT - Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase

HRP - (engl.) Horse Radish Peroxidase

i.p. - intraperitoneal

i.v. - intravenös

IBD - (engl.) Infectious Bowel Disease

IEL - Intraepitheliale Lymphozyten

IFN- $\gamma$  - Interferon gamma

IL - Interleukin

IRF - Interferon-regulierender Faktor

kd - Kilodalton

kg - Kilogramm

KM - Knochenmark

LC - Light Cycler

LPL - Lamina propria Lymphozyten

LPS - Lipopolysaccharid

MHC - (engl.) Major Histocompatibility Complex

Min. - Minuten

ml - Milliliter

MLN - Mesenteriale Lymphknoten

mm - Millimeter

mM - Millimolar

MMP - Matrixmetalloproteinasen

MPI - Max-Planck-Institut

Mtb - Mykobakterium tuberculosis

MyD88 - Myeloid Differentiation primary response gene (88)

n - Anzahl

NF $\kappa$ B - (engl.) Nuclear Factor-kappa B

ng - Nanogramm

nGZ - Neutrophile Granulozyten

NK-Zellen - natürliche Killerzellen

nm - Nanometer

o.b. - oben besprochen

p.o. - per os

PAP - Peroxidase-anti-Peroxidase

PBS - Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR - Polymerase Kettenreaktion

PE - Phycoerythrin

Pen-Strep - Penicillin-Streptomycin

pg - Picogramm

PGE2 - Prostaglandin E2

PGN - Peptidoglycan

PMA - Polymycin A

qRT-PCR - quantitative Real-Time PCR

R - Rezeptor

RA - Rheumatoide Arthritis

rad - (engl.) radium absorbed dosis

RNA - Ribonukleinsäure

rpm - (engl.) rounds per minute

RT - Raumtemperatur

RT-PCR - Reverse Transkriptase PCR

s.o. - siehe oben

sek - Sekunde

SOCS - (engl.) Supressors of Cytokine Signalling

sog. - sogenannten

spp. - Spezies

STAT - (engl.) Signal Transducers and Activators of Transcription

std. - Stunde

T - Thymidin

Tab. - Tabelle

TCR - T-Zell Rezeptor

TF - (engl.) Tissue factor (Gewebsthrombokinasen oder Faktor III)

TGF - Tumor-growth-factor

Th-Zelle - T-Helfer-Zelle

TIMP - Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

TLR - (engl.) Toll-like Receptor

TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TNF - Tumor Nekrose Faktor

Tregs - regulatorische T-Zellen

u. a. - unter anderem

UV - Ultraviolett

V - Volt

v. a. - vor allem

VCAM-1 - (engl.) Vascular cell adhesion molecule 1 (Gefäß Zelle Adhäsion Molekül-1)

VEGF - (engl.) Vascular Endothelial Growth Factor

vs. - versus

WEHI - Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research

WT - Wildtyp

z. B. - zum Beispiel

ZNS - Zentralnervensystem



## **Lebenslauf**

**Aus datenrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf hier nicht angezeigt.**

## Erklärung

„Ich, Anna Caroline Bartelheimer, geb. Nobre Gomes, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Die Bedeutung des Krüppel-like Faktor 4 (Klf4) bei der oralen Infektion mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii*** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

---

Datum

---

Anna Caroline Bartelheimer