

In-vitro- und in-vivo-Untersuchungen zur Neuroinvasion durch *Toxoplasma gondii*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl. Biol.
Sabrina Maria Lachenmaier
aus Ochsenhausen

Februar 2010

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2005 bis Oktober 2009 am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Oliver Liesenfeld angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Liesenfeld
2. Gutachter: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

Tag der Disputation: 12.03.2010

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	10
1.1	Toxoplasma gondii	10
1.2	Stammspezifische Unterschiede bei <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.3	Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.4	Zerebrale Toxoplasmose.....	14
1.5	Barrieren des zentralen Nervensystems (ZNS)	15
1.5.1	Blut-Hirn-Schranke (BHS).....	15
1.5.2	Plexus choroideus.....	16
1.5.3	Arachnoidea mater.....	17
1.6	Transendotheliale Migration	17
1.7	Inflamationsvermittelte Zellmigration in das zentrale Nervensystem	19
1.8	Neuroinvasion durch pathogene Mikroorganismen.....	21
1.9	Dissemination im Wirt und Neuroinvasion durch <i>T. gondii</i>	22
1.10	Zielstellung der vorliegenden Arbeit	23
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Materialien, Lösungen, Geräte, Software.....	25
2.1.1	Reagenzien	25
2.1.2	Verbrauchsmaterial und anderes.....	26
2.1.3	Puffer.....	27
2.1.4	Primer und Sonden für LightCycler®-PCR	28
2.1.5	Antikörper.....	28
2.1.6	Geräte	29
2.1.7	Software	29
2.1.8	Externe Dienstleistungen	29
2.1.9	Tiere	29
2.1.10	Zelllinien und <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten für Zellkultureinsatz	30
2.2	Zellkulturarbeiten	30
2.2.1	Isolierung primärer Rattengliazellen	30
2.2.2	Isolierung primärer Rattenhirnkapillarendothelzellen.....	31
2.2.3	Kokultivierung von Rattengliazellen und primären Rattenhirnkapillarendothelzellen	33
2.2.4	Messung des transendothelialen Widerstandes bei Transwell-Filtern im Kokultursystem.....	33
2.2.5	Permeabilitätsuntersuchungen bei Transwell-Filtern im Kokultursystem	34
2.2.6	Migrationsassay mit Transwell-Filtern im Kokultursystem.....	36
2.2.7	Kultivierung von Zelllinien	37
2.2.8	Passagieren von Zelllinien	37
2.2.9	Kultivierung von <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	38
2.2.10	Infektion von Zellen mit <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	38
2.2.10.1	Infektion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs).....	38
2.2.10.2	Infektion von Endothelzellen.....	39
2.2.11	Kryokonservierung und Regeneration von Zelllinien und <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	39
2.3	Isolierung von PBMCs und mononukleären Zellen des Gehirns durch Dichtegradientenzentrifugation.....	40
2.3.1	Isolierung von PBMCs aus Mäuseblut	40
2.3.2	Isolierung von PBMCs aus Rattenblut	42
2.3.3	Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Gehirn.....	42
2.4	Magnetische Zellseparation	43
2.5	Arbeiten mit Nukleinsäuren	44
2.5.1	DNA-Isolierung aus Gewebe	44
2.5.2	DNA-Aufreinigung über DNA-bindende-Säulen.....	44
2.5.3	Quantitative LightCycler™-Polymerase-Ketten-Reaktion (qLC-PCR).....	45
2.5.4	Genexpressionsanalyse bei Endothelzellen mittels Microarray-Technik.....	46
2.6	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
2.7	Immunfluoreszenzfärbung.....	47
2.8	Durchflusszytometrie.....	48
2.9	Intravenöse Injektion infizierter PBMC-Fractionen.....	49
2.10	Statistische Auswertung	49

3	ERGEBNISSE	50
3.1	In-vitro-Untersuchungen zur Neuroinvasion durch <i>T. gondii</i>	50
3.1.1	Einfluss einer <i>T. gondii</i> -Infektion auf die Immunantwort von Hirnendothelzellen	50
3.1.1.1	Genexpressionsanalysen nach Infektion von Hirnendothelzellen mit <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	50
3.1.1.2	Induktion der endothelialen ICAM-1-Expression durch Zugabe des Zytokins IFN γ und bei einer Infektion mit <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	53
3.1.1.3	Hochregulierung der endothelialen ICAM-1-Expression und Sekretion proinflammatorischer Moleküle nach Infektion mit Typ I-Stamm- (RH) und Typ II-Stamm- (ME49) Tachyzoiten	56
3.1.2	Validierung eines in-vitro-Modells der Blut-Hirn-Schranke (BHS)	60
3.1.2.1	Charakterisierung der primären Zellen durch Immunfluoreszenz	60
3.1.2.2	Physikalische Validierung: TEER-Messung	61
3.1.2.3	Funktionelle Validierung: Permeabilitätsmessung.....	62
3.1.2.4	Funktionelle Validierung: Migration von Ratten-PBMCs in Richtung eines MCP-1-Gradienten	62
3.1.2.5	Blockierung der PBMC-Migration durch Zugabe von anti-Ratten-ICAM-Antikörpern ..	63
3.1.3	Migration von Ratten-PBMCs durch ein in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ..	64
3.1.3.1	Migration von Ratten-PBMCs nach Inkubation der Endothelzellen mit TNF α	64
3.1.3.2	Migration infizierter Ratten-PBMCs	65
3.1.4	Migration von Maus-PBMCs durch ein in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke (BHS)....	68
3.1.4.1	Funktionelle Validierung: Migration von Maus-PBMCs in Richtung eines MCP-1-Gradienten	68
3.1.4.2	Migration infizierter Maus-PBMCs	69
3.1.4.3	Vergleich der Migrationsraten von Maus-PBMCs nach Infektion mit <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten des Typ I-Stammes RH- bzw. des Typ II-Stammes ME49	71
3.2	In-vivo-Untersuchungen zur Neuroinvasion durch <i>T. gondii</i>	74
3.2.1	Isolierung von mononukleären Zellen des Gehirns und durchflusszytometrische Analyse	74
3.2.2	Intravenöse Infektion mit extrazellulären <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten.....	75
3.2.3	Intravenöse Infektion mit intrazellulären <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten.....	75
4	DISKUSSION	77
5	ZUSAMMENFASSUNG	90
6	SUMMARY	92
7	LITERATUR	94
8	ANHANG	112
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	112
8.2	Tabellenverzeichnis.....	113
8.3	Publikationen, Kongressbeiträge/-teilnahmen, Weiterbildungen und Kooperationen.....	114
8.3.1	Publikationen.....	114
8.3.2	Kongressbeiträge	114
8.3.3	Kongressteilnahmen	115
8.3.4	Weiterbildungen	115
8.3.5	Kooperationsprojekte	116

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Destilliertes Wasser
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
BBB	<i>Blood-brain barrier</i>
Bcl-3	<i>B-cell lymphoma 3-encoded protein</i>
bEnd.3	murine Hirnendothelzelllinie
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR	<i>C-C motif chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cdh	Cadherin
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CCR	<i>CC chemokine receptor</i>
COX-2	Cyclooxygenase 2
CR	<i>Complement receptor</i>
CXCL	<i>CXC-chemokine ligand</i>
CXCR	<i>CXC-chemokine receptor</i>
CX ₃ CL	<i>CX₃C-chemokine ligand</i>
CX ₃ CR	<i>CX₃C motif chemokine receptor</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
D-MEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	et alii (und andere)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Fötales Rinderserum)
fg	Femtogramm
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer

g	Gramm bzw. <i>g-force</i> (relative Zentrifugationsbeschleunigung)
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GR-1	Granulozyten-Antigen 1
GRO-1	<i>Growth-regulated oncogene 1</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEVs	<i>High endothelial venules</i>
HFF	<i>Human Foreskin Fibroblasts</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSPG	<i>Heparan sulphate proteoglycan</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN α	Interferon alpha
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IGTP	<i>Interferon gamma induced GTPase</i>
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IP10	<i>Interferon gamma induced protein 10</i>
JAK	Janus Kinase
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	Lymphozytenantigen 6C
Ly6G	Lymphozytenantigen 6G
M	Mol pro Liter
Mac-1	<i>Macrophage 1 antigen</i>
MAdCAM	<i>Mucosal addressin cellular adhesion molecule-1</i>
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

MIC-2	<i>Micronemal protein 2</i>
mL	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary-response gene 88</i>
NEAAs	<i>Non-essential amino acids</i>
NfκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NK cell	<i>Natural killer cell</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
Ω	Ohm
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
pCPT-cAMP	<i>8-(4-Chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDS	<i>Plasma derived serum</i>
Pe	Permeabilitätskoeffizient
PE	<i>R-phycoerythrin</i>
PECAM-1	<i>Platelet/endothelial cell-adhesion molecule 1</i>
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
pg	Pikogramm
pRBEC	<i>Primary rat brain endothelial cell</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
qLC-PCR	quantitative LightCycler-PCR
Ro 20-1724	<i>4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)imidazolidin-2-one</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
rmIFNγ	Rekombinantes Maus-Interferon gamma
ROP	<i>Rhoptry protein</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rrIFN γ	Rekombinantes Ratten-Interferon gamma
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signalling</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>Tricine buffered saline</i>
TE	Toxoplasma-Enzephalitis
TEER	<i>Transendothelial electrical resistance</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TJ	<i>Tight junction</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride hydrate</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
v/v	<i>Volume per volume</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell-adhesion molecule 1</i>
VE-Cadherin	<i>Vascular endothelial cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
w/v	<i>Weight per volume</i>
ZO-1	Zona occludens 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZSF	Zerebrospinalflüssigkeit

1 Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii*

T. gondii ist ein weltweit verbreiteter, obligat intrazellulärer Parasit und zählt zu den am häufigsten vorkommenden parasitären Infektionserregern [1]. Toxoplasmen gehören dabei wie auch Eimerien, Cryptosporidien und Plasmodien zum Stamm der Apicomplexa sowie der Klasse der Sporozoa. Da sich Toxoplasmen im Vergleich zu anderen Apicomplexa genetisch leicht manipulieren und in Zellkulturen in großem Maßstab vermehren lassen, wird *T. gondii* häufig als Modellorganismus für die Apicomplexa-Forschung verwendet [2, 3].

Es existieren drei Stadien von *T. gondii*, die durch einen komplexen Lebenszyklus miteinander verbunden sind und einen fakultativen Wirtswechsel einschließen (Abbildung 1). Mensch und Tier können sich dabei durch den Verzehr von zystenhaltigem Fleisch oder durch die Aufnahme von Oozysten mit *T. gondii* infizieren [4, 5].

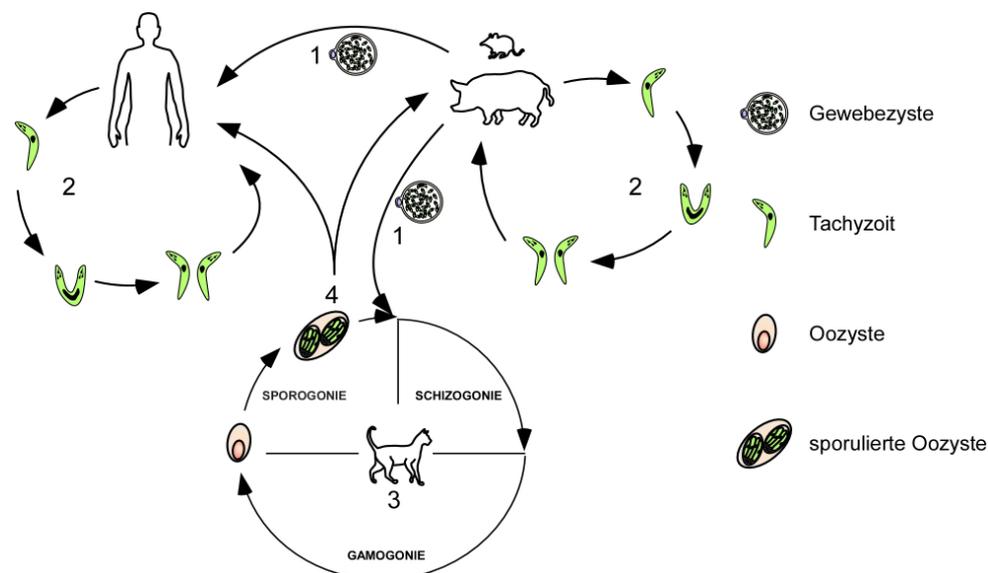


Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *T. gondii*. (1) Die orale Infektion mit *T. gondii* erfolgt hauptsächlich durch den Verzehr von zystenhaltigem Fleisch und Gewebe. (2) Tachyzoiten disseminieren daraufhin im Körper des Zwischenwirtes (Mensch, Nutztiere, Nager etc.) und vermehren sich asexuell durch Endodyogenese. Unter dem Einfluss des Immunsystems bilden sich wiederum Gewebezysten. (3) Bei der Infektion einer Katze als Endwirt von *T. gondii* durchlaufen Tachyzoiten verschiedene Fortpflanzungsstadien, welche zur Ausscheidung von Oozysten führen. (4) Sporulierte Oozysten sind sowohl für den End- als auch für den Zwischenwirt eine Infektionsquelle.

Tachyzoiten stellen eine sich schnell replizierende Form des Parasiten dar, die im gesamten Wirtsorganismus disseminieren und Wirtszellen durch aktive Penetration infizieren können [6] (Abbildungen 2A, B). Dabei entsteht in der Wirtszelle eine parasitophore Vakuole, die dem Parasiten Schutz vor dem Immunsystem bietet [7]. Die asexuelle Vermehrung des Parasiten erfolgt durch sogenannte Endodyogenie, bei der im Inneren einer Mutterzelle zwei Tochterzellen gebildet werden (Abbildung 1, Abbildung 2C) [3]. Unter dem Einfluss der körpereigenen Immunantwort wandeln sich intrazelluläre Tachyzoiten in sich langsam vermehrende Bradyzoiten um, die v. a. in Zellen des ZNS und der quergestreiften Muskulatur in Gewebezysten persistieren. Gewebezysten stellen dabei die zweite infektiöse Form des Parasiten dar [8, 9]. Die sexuelle Vermehrung von *T. gondii* vollzieht sich ausschließlich im Darm von Katzen durch Proliferation des Parasiten in Darmepithelzellen (Schizogonie, Zerfallsteilung) und Bildung von Makro- und Mikrogameten (Gamogonie) (Abbildung 1) [3]. Durch Vereinigung von Makro- und Mikrogameten entstehen befruchtete Eizellen, die während des Vorgangs der Sporogonie reifen und in ihrem Inneren infektiöse Sporozoiten entwickeln (Abbildung 1, Abbildung 2D). Diese sporulierten Oozysten werden anschließend von Katzen ausgeschieden und stellen die dritte infektiöse Form von *T. gondii* dar [10, 11, 12].

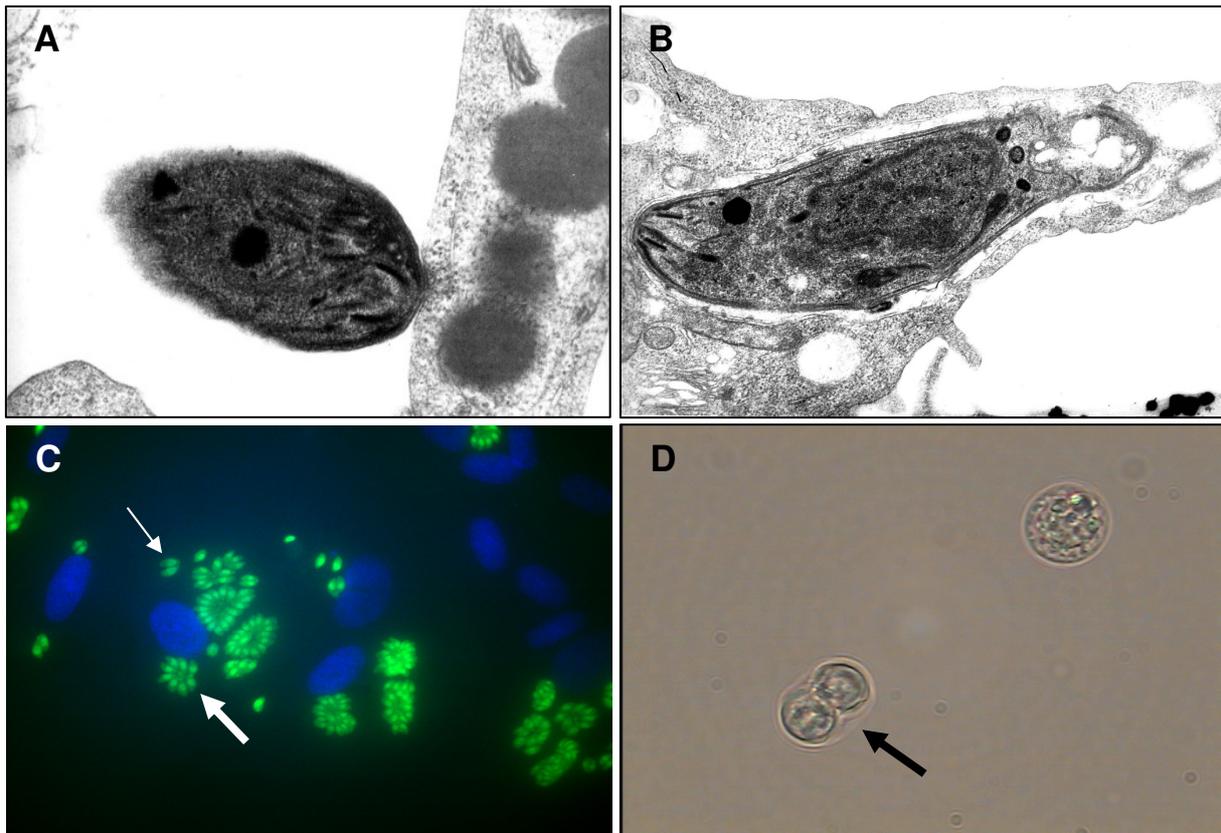


Abbildung 2: Infektiöse Formen von *T. gondii*. (A) Aktive Infektion von humanen Hirndendothelzellen durch *T. gondii*-Tachyzoiten des RH-Stammes (TEM, 57.000-fache Vergrößerung). (B) Nach der Infektion wird der Tachyzoit von einer parasitophoren Vakuole umgeben, in der die asexuelle Vermehrung stattfindet (TEM, 38.000-fache Vergrößerung). (C) Asexuelle Vermehrung von GFP-exprimierenden *T. gondii*-Tachyzoiten (grün) in einer parasitophoren Vakuole. Bei der Proliferation entstehen durch Endodyogenie aus einer Mutterzelle jeweils zwei Tochterzellen (dünner Pfeil). Diese ordnen sich bis zur Lyse der parasitophoren Vakuole charakteristischerweise in Rosettenform an (dicker Pfeil). Zellkerne sind blau dargestellt. (D) Sporulierte Oozyste mit je zwei Sporozoiten (Pfeil).

1.2 Stammspezifische Unterschiede bei *Toxoplasma gondii*

Die in Europa und Nordamerika verbreiteten Toxoplasmen können hauptsächlich in drei klonale Linien unterteilt werden (Typen I, II und III). Toxoplasma-Infektionen beim Menschen erfolgen zumeist durch Typ II-Stämme [13]. Es ist bisher nicht ausreichend geklärt, ob unterschiedliche Stämme auch für unterschiedliche Krankheitsbilder beim Menschen verantwortlich sind, jedoch scheint der Typ II-Stamm bei AIDS-Patienten sowie konnatalen Infektionen zu dominieren [14, 15, 16]. Die Virulenz der klonalen Linien im Tiermodell ist unterschiedlich; Typ I-Stämme gelten im Mausmodell als virulent (letale Dosis (LD_{100}) entspricht einem Parasiten), während Typ II- und Typ III-Stämme als avirulent (mittlere letale Dosis (LD_{50}) entspricht $\geq 10^5$ Parasiten) gelten [14, 17, 18, 19]. Die drei klonalen Linien von *T. gondii* können zusätzlich anhand ihres Wachstums- und Migrationsverhaltens unterschieden werden [19]. Die Unterschiede im Virulenzverhalten werden auf

Rhoprienproteine (ROPs) zurückgeführt, welche von apikal gelegenen Organellen (Rhoprien) des Parasiten sezerniert werden [20, 21]. Der RH-Stamm von *T. gondii* wird häufig als Modellorganismus für Typ I-Stämme verwendet, während der ME49-Stamm als Beispiel für Typ II-Stämme eingesetzt wird [22].

1.3 Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Eine Infektion mit *T. gondii* kann auf unterschiedlichste Arten erfolgen. Rohes oder ungenügend gekochtes Fleisch bildet durch darin enthaltene Gewebezysten eine häufige Infektionsquelle [23]. Ebenso führen mit Oozysten kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser zur Aufnahme des Parasiten [24, 25]. De Craeye et al. konnten zeigen, dass ein Viertel der untersuchten Katzen in Belgien seropositiv für *T. gondii*-Antikörper waren [26]. Bei einer konnatal erworbenen Toxoplasmose wird ein Fötus bereits im Mutterleib infiziert. Die Übertragung des Parasiten erfolgt fast ausschließlich bei Frauen, die während der Schwangerschaft erstmalig infiziert werden [27]. Weitere Infektionsgefahr geht von der Transplantation infizierter Organe, der Transfusion infizierter Blut- und Leukozytenkonserven [28, 29, 30] oder der Handhabung isolierter Parasiten in Laboratorien aus [31].

Bei AIDS-Patienten, die aufgrund des Zusammenbruchs der spezifischen Immunität den Erreger nicht mehr kontrollieren können, entwickelt sich als häufigste Art der ZNS-Infektionen eine Toxoplasma-Enzephalitis (TE). Als kritisch gilt hierfür ein Wert von unter 100 CD4⁺-Zellen pro μ L Blut [32]. Untersuchungen von Grant et al. ergaben, dass circa ein Drittel der mit *T. gondii* infizierten HIV-positiven Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung eine TE entwickeln [33]. Aufgrund der geringeren Seroprävalenz erkranken in den USA etwa 3% bis 10% der AIDS-Patienten an TE, während in Europa und Afrika aufgrund der höheren Seroprevalenz sogar 25% bis 50% der AIDS-Patienten erkranken [34]. Zusätzlich zur Entwicklung einer TE oder der Schädigung des ungeborenen Kindes kann sich die Infektion mit *T. gondii* sowohl pränatal als auch postnatal in einer Toxoplasma-Chorioretinitis manifestieren [35, 36]. In neueren Studien mehren sich die Hinweise, dass das Vorhandensein von *T. gondii* im Gehirn auch psychologische Veränderungen des Wirtes nach sich zieht [37, 38, 39]. Dabei könnte das Auftreten von bestimmten Formen der Depression und Schizophrenie in einer *T. gondii*-Infektion begründet sein [40, 41].

1.4 Zerebrale Toxoplasmose

Erfahren latent infizierte Personen eine Immunsuppression (AIDS, Tumor- und Transplantationspatienten) kann es zum Aufbrechen der im Gehirn vorhandenen Toxoplasmazysten und einer Proliferation von Tachyzoiten kommen. Dies resultiert unter Umständen in einer unbehandelt tödlich verlaufenden Reaktivierungstoxoplasmose mit Enzephalitis und Dissemination des Parasiten im gesamten Organismus [27]. Die Produktion von IFN γ ist eine wichtige Voraussetzung für das Immunsystem, um sowohl eine akute als auch eine chronische Infektion mit *T. gondii* zu kontrollieren. Als primäre Antwort auf eine Infektion sezernieren Makrophagen, neutrophile Granulozyten sowie dendritische Zellen (DCs) das proinflammatorische Zytokin IL-12, welches wiederum essentiell für die Induktion einer IFN γ -Produktion ist [42]. Aktivierte antigenpräsentierende Zellen wie DCs und Monozyten induzieren zusammen mit IFN γ die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die für die effektive Kontrolle einer *T. gondii*-Infektion unerlässlich sind [43]. Bei einer akuten Toxoplasma-Enzephalitis wandern sowohl Monozyten als auch CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in das Gehirn [44]. Durch entsprechende IFN γ -Sekretion werden wiederum residente Mikrogliazellen und Astrozyten aktiviert [45, 46], die verschiedene Mechanismen zur Abwehr des Parasiten induzieren. Mikrogliazellen stellen dabei eine Makrophagenpopulation im Gehirn dar, die eine entscheidende Rolle bei der Prävention einer TE spielt [47]. Aktivierte Mikroglia sezernieren die Zytokine IL-10, TNF α sowie IFN γ und exprimieren neben MHC II-Molekülen auch LFA-1 und ICAM-1, die als Adhäsionsmoleküle dienen können [48, 49, 50]. Ebenso wie bei Mikroglia ist bei dendritischen Zellen die Produktion von NO ein wichtiger antiparasitärer Mechanismus [51, 52]. Astrozyten sind neben Neuronen am häufigsten Wirtszellen für Toxoplasmazysten im Gehirn. Sie inhibieren das Wachstum des Parasiten durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten, der Aktivierung der Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO, Abbau von Tryptophan) oder der Wirkung von kleinen GTPasen wie IGTP [53, 54, 55]. Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) bilden eine bedingte Barriere bei der Neuroinvasion durch *T. gondii*. Eine IFN γ -induzierte IDO-Aktivierung in Endothelzellen hemmt somit von Beginn an die Ausbreitung des Parasiten in das Gehirn [56]. Strack et al. konnten bei Mäusen mit TE nachweisen, dass Astrozyten Hauptproduzenten der chemotaktisch aktiven Zytokine IP-10 und MCP-1 sind, während aktivierte Mikroglia und in das Gehirn infiltrierte Leukozyten

weitere Chemokine sezernieren [57]. Diese Chemokinsekretion ist wiederum verantwortlich für eine verstärkte Neuroinvasion durch Leukozyten [58].

1.5 Barrieren des zentralen Nervensystems (ZNS)

Der zelluläre und molekulare Austausch an den Grenzflächen zwischen Blut, neuronalem Gewebe des zentralen Nervensystems sowie den flüssigkeitsgefüllten Bereichen des Gehirns wird im Wesentlichen über drei Barrieren kontrolliert [59]:

1. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) wird von den zerebrovaskulären Endothelzellen des Gehirns gebildet und unterbindet einen ungehinderten Austausch zwischen Blut und dem Gehirnparenchym bzw. der interstitiellen Flüssigkeit, welche die Zellen des Gehirns umgibt.
2. Die Epithelschicht des Plexus choroideus reguliert den Stoffaustausch zwischen Blut und der Zerebrospinalflüssigkeit im dritten und vierten sowie den lateralen Ventrikeln.
3. Das arachnoidale Epithel bildet eine Barriere zwischen Blut und dem mit Zerebrospinalflüssigkeit gefüllten Subarachnoidalraum.

1.5.1 Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Die BHS ist eine funktionelle und strukturelle Barriere, die in erster Linie durch hochspezialisierte mikrovaskuläre Endothelzellen gebildet wird. Die Endothelzellen interagieren mit perivaskulären Strukturen wie Perizyten, Mikroglia, Makrophagen sowie Astroglia und erlangen dadurch charakteristische Eigenschaften, die anderen Endothelzellen des Körpers fehlen (Abbildung 3). Astrozyten unterstützen durch die Sekretion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Steroiden die Aufrechterhaltung von Barrierefunktionen wie geringer Permeabilität und hohem transendotheliale Widerstand [60, 61]. In-vitro-Modelle, die neben Endothelzellen und Astrozyten auch Perizyten miteinbeziehen, erreichen dabei den größten transendothelialen Widerstand [62]. Diese neurovaskuläre Einheit ist essentiell für die Funktion des zentralen Nervensystems. In seinen „Arbeiten zum Sauerstoffbedürfnis des Organismus“ stellte Paul Ehrlich bereits 1885 fest, dass das Gehirn trotz intravenöser Farbstoffinjektion keine Färbung aufwies [63]. Ohne Wissen über die BHS führte er seine Beobachtungen auf die „Feinmaschigkeit“ des Organs zurück. Tatsächlich schützt die BHS das Gehirn vor Schwankungen in der Zusammensetzung der

Plasmakomponenten sowie vor dem Eintritt potentiell schädlicher Moleküle und Zellen. Durch spezifische Rezeptoren und Transportproteine bedient die BHS zusätzlich die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und unterstützt die Entsorgung von Stoffwechselendprodukten über den Blutkreislauf. Weitere charakteristische Eigenschaften dieser Endothelzellen sind ein stark eingeschränkter Ionenaustausch mit dem Blut, eine geringe pinozytotische Aktivität und fehlende Fenestrierungen der Endothelzellen [64, 65, 66]. Die Bereiche zwischen den Endothelzellen, die sogenannten Tight junctions, sind durch verschiedene Tight junction-Proteine fest miteinander verbunden und kontrollieren somit den parazellulären Flux von Immunzellen und kleinen hydrophilen Molekülen (Abbildung 4A). Große hydrophile Moleküle wie Peptide und Proteine werden durch rezeptorvermittelte, transportervermittelte oder adsorptionsvermittelte Transzytose aufgenommen. Gasförmige Moleküle und lipophile Substanzen wie Ethanol können durch die Lipidmembran der Endothelzellen diffundieren [67, 68].

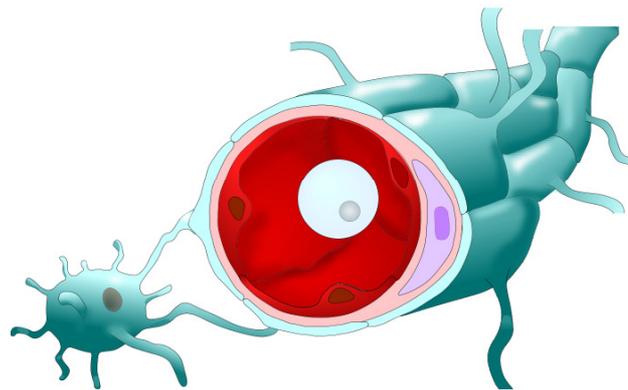


Abbildung 3: Querschnitt durch die BHS. Das Lumen der zerebralen Mikrokapillaren wird von spezialisierten Endothelzellen (rot) ausgekleidet, welche für die charakteristischen Eigenschaften der BHS verantwortlich sind und die erste Barriere für extravasierende Leukozyten (weiß) darstellen. Die einzelnen Endothelzellen sind durch Tight junctions fest miteinander verbunden. Eingebettet in die Basallamina (rosa) liegen Perizyten (violett) eng an den Endothelzellen an. Die Ausläufer von Astrozyten (blau) umhüllen die Kapillaren und stehen in engem räumlichem Kontakt mit Perizyten und Endothelzellen.

1.5.2 Plexus choroideus

Der Plexus choroideus ist ein stark vaskularisierter Bereich in den vier Gehirnventrikeln, der für die Produktion von Zerebrospinalflüssigkeit verantwortlich ist. Die Epithelschicht des Plexus choroideus stellt somit eine Barriere zwischen der Zerebrospinalflüssigkeit und dem Blutkreislauf dar (Abbildung 4B). Die Kapillaren des Plexus choroideus besitzen im Gegensatz zur BHS ein gefenestertes Endothel, das

somit für Makromoleküle und zelluläre Komponenten durchlässig ist. Zum Ausgleich dieser fehlenden Endothelbarriere sind die Epithelzellen des Plexus choroideus durch Tight junction-Proteine verbunden [69, 70]. Diese sind jedoch nicht durchgängig vorhanden und stellen kein Äquivalent zur eigentlichen BHS dar.

1.5.3 Arachnoidea mater

In der äußeren Hirnhautschicht (Dura mater) verlaufen ebenfalls fenestrierte Blutgefäße, die als potentiell undichte Stellen den Austausch zwischen Blutbestandteilen und der subarachnoidalen Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF) zulassen könnten (Abbildung 4C). Die unterhalb der Dura mater gelegene Arachnoidea mater ist aus zwei Zellschichten aufgebaut, deren äußere Zellen wiederum durch Tight junctions verbunden und somit gegen einen freien Stoffaustausch abgedichtet werden [69].

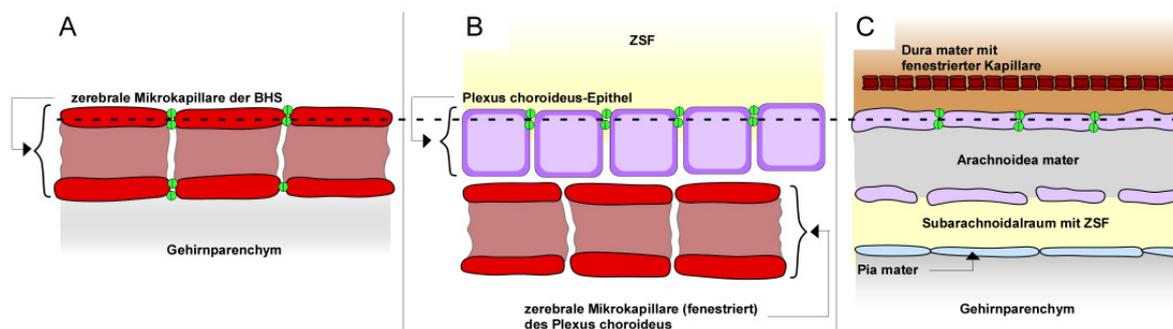


Abbildung 4: Darstellung verschiedener Barrieren des Gehirns. (A) Bei den Mikrokapillaren der Blut-Hirn-Schranke werden die Räume zwischen Endothelzellen (rot) durch Tight junctions (grün) begrenzt und bilden so eine selektive Barriere in Richtung des Gehirnparenchyms (grau). (B) Die Kapillaren des Plexus choroideus bilden ein fenestriertes Endothel (rot) aus, wobei Tight junctions (grün) zwischen den darüberliegenden Epithelzellen (lila) die Zerebrospinalflüssigkeit (ZSF) vor schädlichen Komponenten aus dem Blut schützen. (C) Der mit ZSF gefüllte Subarachnoidalraum wird hier durch Tight junctions (grün) zwischen den Zellen der Arachnoidea mater (lila) gegen einen Austausch mit Blutbestandteilen abgeschirmt.

1.6 Transendotheliale Migration

Im Rahmen einer Entzündung verlassen zirkulierende Leukozyten die Blut- oder Lymphbahnen und wandern über das Endothel in entzündetes Gewebe ein. Beim Homing von Leukozyten findet die Extravasation in lymphatisches Gewebe über ein spezialisiertes Endothel, die sogenannten High Endothelial Venules (HEVs), statt [71, 72]. Die transendotheliale Migration von Leukozyten ist dabei eine konzertierte Abfolge von Adhäsionsschritten, an deren Ende die Überwindung der

Endothelbarriere, der Basallamina und der extrazellulären Matrix steht (Abbildung 5) [73, 74, 75]. Diese protektive Immunantwort muss jedoch streng kontrolliert werden, da eine überschießende oder fehlgeleitete Entzündungsreaktion im Gegenzug schwere Pathologien verursachen kann.

Der initiale Kontakt zwischen zirkulierenden Leukozyten und dem Endothel wird als Tethering und Rolling bezeichnet und durch Proteine der Selektin-Familie (E-, P-, L-Selektin) und deren Liganden vermittelt [76, 77]. P-Selektin wird von Endothelzellen und aktivierten Blutplättchen exprimiert. In Endothelzellen liegt P-Selektin in sogenannten Weibel-Palade-Körperchen vor, und kann von dort nach Stimulation der Zellen an die Oberfläche der Plasmamembran transportiert werden [78]. Die Expression von E-Selektin beschränkt sich ausschließlich auf Endothelzellen und ist nicht konstitutiv, sondern durch inflammatorische Mediatoren wie IL-1, TNF α und LPS mediiert [79]. L-Selektin wird von Leukozyten an der Oberfläche der Mikrovilli konstitutiv exprimiert [80]. Als Liganden erkennen Selektine sulfatierte, sialylierte und fucosylierte Glykoproteine und Glykolipide, wie beispielsweise das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis X (sLe^x) [74]. Der nächste Schritt in der Adhäsionskaskade ist eine Steigerung der Bindungsaffinität zwischen Leukozyten und dem Endothel. Mediatoren hierfür sind vor allem endothelgebundene Chemokine wie IL-8, MCP-1 oder SDF-1. Aktivierte Integrine können über die Bindung endothelialer Adhäsionsmoleküle eine feste Anbindung der Leukozyten an das Endothel vermitteln (Activation und Arrest). Für die Adhäsion sind besonders die Leukozytenintegrine VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$), Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) und $\alpha_4\beta_7$ sowie deren endotheliale Liganden VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 und MAdCAM-1 von Bedeutung [81].

Nachdem die Leukozyten fest an die Endotheloberfläche angelagert sind, wandern diese entlang des Endothels zu Zell-Zell-Verbindungen, um eine geeignete Stelle für die Transmigration zu finden (Intravascular crawling) [82]. Der Vorgang der Extravasation kann parazellulär bzw. transzellulär sein. Bei der parazellulären Migration werden die Leukozyten mit Hilfe eines chemokininduzierten Gradienten sowie entlang eines haptotaktischen Gradienten zwischen zusammenliegenden Zellen hindurchgeleitet. Leukozytäres LFA-1 interagiert dabei mit ICAM-1 und ICAM-2, während PECAM-1, CD99, JAM-A, JAM-B und JAM-C bevorzugt homophile Interaktionen eingehen. Neben der parazellulären Migration konnte auch die transzelluläre Migration von Leukozyten nachgewiesen werden [83]. Diese findet an

Stellen mit vergleichsweise dünner Endothelschicht statt und betrifft je nach Zellpopulation bis zu 15% der migrierenden Leukozyten [84]. Der Kontakt von Leukozyten mit Endothelzellen führt zur Konzentrierung von ICAM-1, VCAM-1, Aktin und Caveolin-1 in definierten Endothelzellbereichen und zur Bildung von Caveolae. Diese Caveolae können miteinander fusionieren und bilden eine Anhäufung von miteinander verbundenen Organellen (vesikulo-vakuoläre Organellen). Diese Organellen können das vaskuläre Lumen mit dem extravaskulären Bereich verbinden und ermöglichen so die Extravasation von Makromolekülen. Möglicherweise bildet diese Fusion die Grundlage für einen „Migrationskanal“ durch die betroffene Endothelzelle, der von Leukozyten zur transzellulären Migration genutzt werden kann [73, 84, 85, 86, 87]. Um in entzündetes Gewebe vordringen zu können, muss nach Migration über die endotheliale Barriere die perivaskuläre Schicht aus Perizyten und Basallamina überwunden werden. Dabei spielen vor allem leukozytäre alpha6-Integrine (Lamininrezeptoren) und proteolytische Enzyme wie MMP-9 und die Neutrophilen-Elastase eine wichtige Rolle [88, 89].

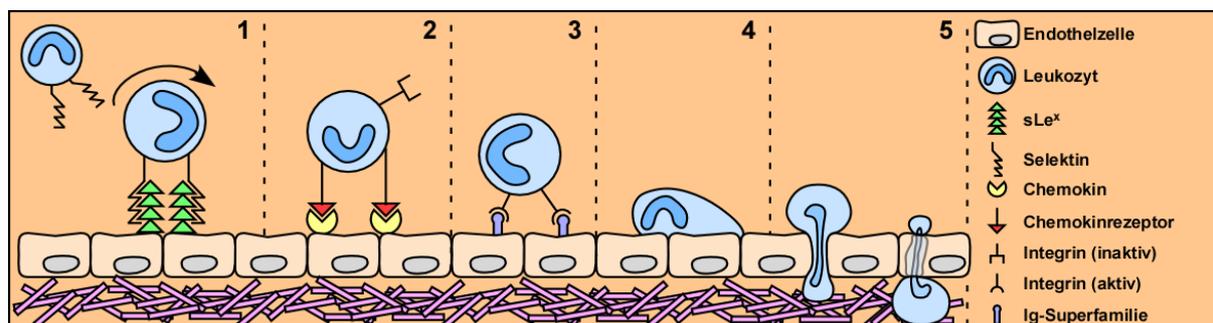


Abbildung 5: Transendotheliale Migration. (1) Tethering, Rolling: Selektine auf Leukozyten erkennen Liganden wie beispielsweise das sialierte Lewis^x-Antigen. (2) Activation, Arrest: Durch Interaktion der Leukozyten mit Zytokinen auf der Endotheloberfläche wird die Bindungsaffinität zwischen beiden erhöht. (3) Firm adhesion: Es folgt die Aktivierung von Integrinen, wobei durch die Wechselwirkungen von Integrinen und Molekülen der Ig-Superfamilie (z. B. ICAM-1) die Leukozyten fest an das Endothel adsorbiert werden. (4) Intravascular crawling: Nach einer festen Anheftung an das Endothel beginnen die Leukozyten auf dem Endothel zu wandern, bis eine zur transendothelialen Migration geeignete Stelle gefunden wurde. (5) Extravasation: Die transendotheliale Migration erfolgt dann entweder parader oder transzellulär. (Modifiziert nach Ley et al., 2007 [73])

1.7 Inflammationsvermittelte Zellmigration in das zentrale Nervensystem

Unter dem „immunologisch privilegierten“ Zustand des ZNS versteht man die Tatsache, dass das Vorhandensein bestimmter Fremdantigene im ZNS-Parenchym dem systemischen immunologischen Erkennungssystem entgeht, um eine unwiederbringliche Zerstörung von neuronalem Gewebe durch zytotoxische Zellen zu

verhindern. Dieser immunologisch privilegierte Status des Gehirns wird durch die geringe Expression von MHC I- und MHC II-Molekülen erreicht. Ebenso unterbindet die BHS den freien Eintritt von Lymphozyten [90]. Mikroglia, Makrophagen und perivaskuläre Zellen zirkulieren dennoch im Rahmen einer unspezifischen Kontrollfunktion vom Blut in das Gehirnparenchym und wieder zurück in das Gefäßsystem (Surveillance). Auch T-Zellen vermitteln diese Surveillance und verbleiben erst nach Erkennung von Fremdartigen im Gehirn [91, 92].

Im gesunden Zustand exprimieren die Endothelzellen der BHS nur wenige Adhäsionsmoleküle, die von Leukozyten zur transendothelialen Migration genutzt werden können. Im Rahmen von pathologischen Prozessen kommt es zur vermehrten Ausschüttung von Zytokinen wie IFN γ und TNF α , welche wiederum die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle in Endothelzellen induzieren. Ähnlich wie bei einer chronischen Inflammation können Protozoeninfektionen des ZNS zu solchen immunpathologischen Veränderungen führen [93]. Mikroglia und Makrophagen stellen zwei verwandte Zelltypen dar, die als primäre Sensoren einer Hirnpathologie agieren, indem sie schnell zum Ort der Infektion oder Entzündung wandern und neben Zytokinen und Chemokinen auch Adhäsionsmoleküle synthetisieren [94]. Ein unkontrollierter Einstrom von Immunzellen in das Gehirn führt jedoch zu schweren ZNS-Schädigungen. Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen des ZNS wie der Multiplen Sklerose oder der murinen Autoimmunenzephalitis wandern vor allem autoreaktive T-Zellen in das Gehirn ein, welche Myelin und axonale Fortsätze zerstören [95]. Mikroglia und Makrophagen unterstützen dabei den Krankheitsprozess durch die Antigen-Präsentation an T-Zellen und ihre Zytokinproduktion [94]. Gerade CD11b⁺- und CD11c⁺-Zellen finden sich in der Literatur häufig im Zusammenhang mit inflammatorisch bedingter Zellmigration in das ZNS [96, 97, 98, 99]. Der Oberflächenmarker CD11b (Mac-1 α , Integrin α M-Kette) stellt dabei eine Untereinheit des CD11b/CD18 Heterodimers (Mac-1-Integrin) dar und wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen sowie Mikroglia-Zellen exprimiert, zu einem geringen Teil aber auch von Granulozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen. Der Oberflächenmarker CD11c bildet zusammen mit dem Antigen CD18 das Integrin gp150/95, welches vor allem auf dendritischen Zellen (DCs) zu finden ist.

1.8 Neuroinvasion durch pathogene Mikroorganismen

Viele humanpathogene Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, bis in das ZNS vorzudringen. Der Eintritt geschieht entweder über das Endothel der zerebralen Mikrokapillaren oder über die Epithelschicht des Plexus choroideus. Jedoch verursacht nur eine Minderheit von Erregern eine Mehrzahl von Enzephalitis- bzw. Meningitis-Erkrankungen [100].

Die wichtigsten zerebral-pathogenen Mikroorganismen können wie in Tabelle 1 dargestellt in die fünf Erregergruppen der Bakterien, Würmer, Protozoen, Viren und Pilze unterteilt werden.

Tabelle 1: Zerebral-pathogene Mikroorganismen

Bakterien	Protozoen
<i>Escherichia coli</i> [101]	<i>Toxoplasma gondii</i> [27]
<i>Neisseria meningitidis</i> [102]	<i>Trypanosoma brucei</i> [115]
<i>Listeria monocytogenes</i> [103]	<i>Balamuthia mandrillaris</i> [116]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> [104]	<i>Entamoeba histolytica</i> [117]
<i>Treponema pallidum</i> [105]	
<i>Borrelia burgdorferi</i> [106]	Viren
	HI-Virus [107]
	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus [108]
Würmer	Pilze
<i>Schistosoma mansoni</i> [109, 110]	<i>Candida albicans</i> [118, 119]
<i>Taenia solium</i> [111]	<i>Cryptococcus neoformans</i> [120]
<i>Echinococcus granulosus</i> [112]	
<i>Toxocara canis</i> [113]	
<i>Trichinella spiralis</i> [114]	

Bakterielle Infektionen des ZNS werden unter anderem durch *Escherichia coli* [101], *Neisseria meningitidis* [102], *Listeria monocytogenes* [103], *Mycobacterium tuberculosis* [104], *Treponema pallidum* [105] und *Borrelia burgdorferi* [106] ausgelöst. Virale Enzephalitiserreger sind beispielsweise das HI- [107] oder Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus [108]. Ursächlich für zerebrale

Wurminfektionen sind unter anderem Saugwürmer (*Schistosoma mansoni*) [109, 110], Bandwürmer (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*) [111, 112] und Fadenwürmer (*Toxocara canis*, *Trichinella spiralis*) [113, 114]. Protozoeninfektionen des Gehirns können durch *Toxoplasma gondii* [27], *Trypanosoma brucei* [115] und die Amöbenarten *Balamuthia mandrillaris* [116] sowie *Entamoeba histolytica* [117] ausgelöst werden. Daneben existieren Pilzinfektionen des Gehirns, die v. a. auf *Candida albicans* [118, 119] oder *Cryptococcus neoformans* [120] zurückzuführen sind.

Neben dem Ort des Erregereintritts in das zentrale Nervensystem kann auch der Mechanismus der Neuroinvasion von Bedeutung sein. Man unterscheidet zwischen parazellulärer und transzellulärer Migration und berücksichtigt hierbei den Weg über die zu überwindenden zellulären Barrieren. Bei den Pathogenen *Trypanosoma brucei* [121] und *Borrelia burgdorferi* [122] deuten die Ergebnisse von in-vitro-Versuchen darauf hin, dass die Überquerung der BHS über einen parazellulären Weg erfolgt. *Cryptococcus neoformans* [120], *Candida albicans* [119], *Escherichia coli* [101] sowie Meningokokken und *Streptococcus pneumoniae* [123] infizieren Endothelzellen der BHS oder werden von diesen aufgenommen und überwinden so die Barriere in Richtung des ZNS.

Neben den genannten Wegen unterscheidet man die extrazelluläre Migration der Pathogene vom Mechanismus des „Trojanischen Pferdes“. Bei letzterem dienen infizierte Wirtszellen als Vehikel zum Transport der jeweiligen Erreger. Für *Listeria monocytogenes* [124] wurde eine extrazelluläre Migration nachgewiesen. Andere Arbeitsgruppen konnten zusätzlich zeigen, dass *Listeria monocytogenes* bestimmte Leukozytenpopulation zur Wanderung über die BHS nutzt [125, 126]. Die Infektion mit dem HI-Virus resultiert wiederum in einer Beeinträchtigung der BHS-Funktion und führt somit zur vermehrten Wanderung potentiell infizierter Monozyten in das Gehirn [127].

1.9 Dissemination im Wirt und Neuroinvasion durch *T. gondii*

Eine akute *T. gondii*-Infektion ist durch die Proliferation von Tachyzoiten in verschiedenen Organen gekennzeichnet. Die erfolgreiche Dissemination des Parasiten hängt mit seiner Fähigkeit zusammen, die Endothelien der Blut- und Lymphgefäße zu überqueren, sodass selbst die BHS keine ausreichende Barriere für

den Parasiten darstellt. [128, 129, 130]. Der Prozess der systemischen Dissemination von *T. gondii* ist nach heutigem Stand der Wissenschaft jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

Ein Teil der disseminierenden Tachyzoiten liegt in extrazellulärer Form vor [19]. Da die Wanderung von Toxoplasmen durch gleitende Bewegungen erfolgt [131, 132], legt dies den Schluß nahe, dass die Verteilung im Körper des Wirtes durch den Parasiten aktiv betrieben wird.

Tachyzoiten infizieren dabei unter anderem Lamina propria-Leukozyten, welche als „Trojanische Pferde“ für die Dissemination über den Körper genutzt werden können [128]. Das migratorische Potential von Tachyzoiten hängt vom jeweiligen Genotyp des Parasiten sowie der Form, in der er vorliegt, ab. Barragan et al. konnten in Versuchen zeigen, dass extrazelluläre Tachyzoiten eines Typ I-Stamms wesentlich weitere Strecken zurücklegen und zelluläre Barrieren besser überqueren konnten als Tachyzoiten des Typ II-Stamms [133]. Studien von Lambert et al. belegen wiederum, dass gerade eine Infektion mit Typ II-Tachyzoiten bei dendritischen Zellen einen hypermotilen Leukozytenphänotyp induziert, der vermehrt zelluläre Barrieren überwindet und so Parasiten transportieren könnte [134].

1.10 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Die latente Infektion mit dem Parasiten *T. gondii* ist eine der häufigsten Infektionen des Menschen. Da das Immunsystem die Entwicklung von Gewebezysten im Gehirn kontrolliert, kann es im Falle einer Immunsuppression zum Aufbrechen der Zysten und einer unbehandelt tödlich verlaufenden TE kommen [135]. Bisher ist jedoch nur unzureichend erforscht, welche Wirtszellen und zellulären Mechanismen überhaupt zur Neuroinvasion durch *T. gondii* beitragen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von Endothelzellen und Leukozyten bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch den Parasiten *T. gondii* zu untersuchen. Es existieren Hinweise aus der Literatur, dass *T. gondii* als extrazellulärer Parasit die BHS überquert, aber ebenso in der Lage ist, Wirtsleukozyten als Transportmittel zu nutzen. Anhand von in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen zur Genexpression von Endothelzellen, durchflusszytometrischen Untersuchungen sowie Funktionalitäts- und Migrationsassays wurden in der vorliegenden Arbeit weiterführende

Erkenntnisse zum Mechanismus der Neuroinvasion des Parasiten sowie zur Rolle verschiedener Wirtszellen erhoben.

Im Detail wurden die folgenden Frage- bzw. Aufgabenstellungen bearbeitet:

- Welche Wirtsgene werden bei der Infektion von Hirnendothelzellen mit *T. gondii* hoch- bzw. herunterreguliert?
- Unterscheidet sich die Expression von ICAM-1 bzw. die Sekretion der Zytokine IL-6 und MCP-1 durch Hirnendothelzellen nach Infektion mit *T. gondii*-Stämmen unterschiedlicher Genotypen?
- Welche Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes werden bevorzugt von *T. gondii* infiziert, und in welchen Zellen wandert *T. gondii* durch ein in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke?
- Unterscheidet sich die Qualität bzw. Quantität infizierter Zellen sowie deren transendotheliales Migrationsverhalten nach Infektion mit Toxoplasmen des Genotyps I oder II?
- Lässt sich ein murines in-vivo-Modell etablieren, bei dem die neuroinvasive Kapazität isolierter und mit *T. gondii*-infizierter Leukozytenpopulationen miteinander verglichen werden kann?

Ein besseres Verständnis der Neuroinvasion von Infektionserregern könnte in der Zukunft zu Therapieoptionen führen, die ein Eindringen des Parasiten in das Gehirn unterbinden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien, Lösungen, Geräte, Software

2.1.1 Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

Produkt	Produktnummer	Hersteller
Albumin	A7030	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
AMPUWA® steriles, pyrogenfreies Wasser	0573361/00	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Anti-Maus-CD11b-Microbeads	130-049-001	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
bFGF	11123149001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Collagen G	L7213	Biochrom AG, Berlin
Collagen Typ IV (aus humaner Plazenta)	C5533	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Collagenase (aus <i>Clostridium histolyticum</i>)	C6885	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Collagenase/Dispase (aus <i>Vibrio alginolyticus</i> / <i>Bacillus polymyxa</i>)	10269638001	Roche Diagnostics GmbH
DAKO Eindeckmedium	S3023	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
DAPI	D9542	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
D-MEM	31885-049	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
D-MEM ohne Phenolrot	F0475	Biochrom AG
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DNaseI	1284932	Roche Diagnostics GmbH
DNeasy Blood & Tissue Kit	69506	Qiagen, Hilden
Dulbecco's PBS	H15-002	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8)	15575-038	Invitrogen GmbH
ELISA-Set anti-Maus-IL-6	555240	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
ELISA-Set anti-Maus-MCP-1	555260	Becton Dickinson GmbH
Ethanol	1.00986.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Evans Blue-Farbstoff	E2129	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FBS	S0115	Biochrom AG
Fibronektin (aus Rinderplasma)	F1141	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Forene (Wirkstoff: Isofluran)	2594.00,00	Abbott GmbH, Wiesbaden
Formalin	1.04003.1000	Merck KGaA
HBSS (10x)	14185	Invitrogen GmbH
Heparin-Natrium, 5.000 I.E./mL	PZN: 3029843	Ratiopharm, Ulm
Heparin-Natriumsalz	H3149	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hydrocortison	H0396	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol	1.09634.1011	Merck KGaA
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	12239272001	Roche Diagnostics GmbH
Na ₂ CO ₃	106393	Merck KGaA
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	106580	Merck KGaA
NaCl	1.06404	Merck KGaA
NaHCO ₃	106392	Merck KGaA
Natriumazid	S8032	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natrium-Fluoreszein	46960	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	11140	Invitrogen GmbH
OptiPrep™	1114542	Axis-Shield, Dundee, Schottland
pCPT-cAMP-Natriumsalz	C3912	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PDS	60-00-850	First Link UK Ltd., Birmingham, Großbritannien
Penicillin-/Streptomycinlösung (P/S) (10.000 U/10.000 µg/mL)	A2213	Biochrom AG

Percoll	17-0891-01	GE Healthcare, München
Proteinase K (> 600 mAU/mL)	19133	Qiagen
Puromycin-Dihydrochlorid (aus <i>Streptomyces alboniger</i>)	P7255	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
QIAamp [®] DNA Mini-Kit (250)	51306	Qiagen
Rekombinantes Maus-IFN γ	407303	Calbiochem, Darmstadt
Rekombinantes Maus-MCP-1	12343383	ImmunoTools, Friesoythe
Rekombinantes Ratten-IFN γ	407321	Calbiochem
Rekombinantes Ratten-MCP-1	13343382	ImmunoTools
Rekombinantes Ratten-TNF α	400-14	PeproTech, Hamburg
Rinderalbuminlösung (7,5%ig, für MACS-Puffer)	A8412	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ro 20-1724	B8279	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RPMI	61870	Invitrogen GmbH
Schwefelsäure	X876.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
SDS-Lösung (10%ig)	15553-035	Invitrogen GmbH
TMB-Tabletten	T3405	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tricin	T5816	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris	5429.3	Carl Roth GmbH und Co. KG
Trypanblau (0,5%)	L6323	Biochrom AG
Trypsin (2,5%)	L2133	Biochrom AG
Trypsin-EDTA (0,5% / 0,2%)	L2153	Biochrom AG
Tween [®] 20	P1379	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Wasserstoffperoxid	1.08597.1000	Merck KGaA
Ziegenserum	X0907	DAKO Deutschland GmbH
Zitronensäure	C8532	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.1.2 Verbrauchsmaterial und anderes

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Produktnummer	Hersteller
12 Well-Platten für Kokulturmödel	3513	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
24 Well-Platten	83.1836.300	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht
70 μ m-Zellsiebe	352350	Becton Dickinson GmbH
96 Well-Platten	83.1835.300	Sarstedt AG und Co.
Deckgläser (18 x 18 mm)	BB018018A1	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser für Zellkultur („Coverslips“)	83.1840,002	Sarstedt AG und Co.
Kanüle 18G 1 1/2" (1,2 x 40 mm)	304622	Becton Dickinson GmbH
Kanüle 20G 2 3/4" (0,9 x 70 mm)	4665791	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanüle 22G 1 1/4" (0,7 x 30 mm)	300900	Becton Dickinson GmbH
Kanüle 26G 3/8" (0,45 x 10 mm), mit 1 mL-Spritze	300015	Becton Dickinson GmbH
Kapillaren für LightCycler [™]	I2250.0960	Genaxxon BioScience GmbH, Biberach
Küvetten (UVette [®])	0030106300	Eppendorf AG, Hamburg
MACS-Säulchen	130-042-201	Miltenyi Biotec
Module für ELISA-Platten	469914	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Objektträger	03.0004	Langenbrinck, Emmendingen
Optiseal [™] Ultrazentrifugengefäß (32,4 mL, 26 x 77 mm)	361625	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Pipettenspitzen, 0,5 – 20 μ L	0030000.854	Eppendorf AG
Pipettenspitzen, 2 – 200 μ L	0030000.870	Eppendorf AG
Pipettenspitzen, 100 – 1000 μ L	0030000.919	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	0030125.086	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße, 2 mL	0030125.094	Eppendorf AG

Röhrchen für Durchflusszytometrie	352052	Becton Dickinson GmbH
Röhrchen für Kryokonservierung „Cryovials“	340711	Nunc GmbH & Co. KG
Schlauch für Kryokonservierung („Cryoflex“)	343958	Nunc GmbH & Co. KG
Serologische Pipetten, 2 mL	4486	Corning B.V. Life Sciences
Serologische Pipetten, 5 mL	4487	Corning B.V. Life Sciences
Serologische Pipetten, 10 mL	4488	Corning B.V. Life Sciences
Serologische Pipetten, 25 mL	4489	Corning B.V. Life Sciences
Skpell No. 21 (Einmalgebrauch)	02.001.30,021	Feather, Osaka, Japan
Spritze, 5 mL	300911	Becton Dickinson GmbH
Spritze, 20 mL	300629	Becton Dickinson GmbH
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	HP1002	Pall Medical, Portsmouth, England
Transwell-Platten (0,4 µm Porengröße)	3460	Corning B.V. Life Sciences
Transwell-Platten (3 µm Porengröße)	3462	Corning B.V. Life Sciences
Zellkulturflaschen, 25 cm ²	83.1813.002	Sarstedt AG und Co.
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	83.1813.002	Sarstedt AG und Co.
Zellstofftupfer	13353	Lohman & Rauscher International GmbH & Co KG, Neuwied
Zentrifugenröhren, 15 mL	62.554.502	Sarstedt AG und Co.
Zentrifugenröhren, 50 mL	62.547.254	Sarstedt AG und Co.

2.1.3 Puffer

Tabelle 4: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
30%ige, isotone Percoll-Lösung (15 mL)	4,5 mL Percoll, 0,5 mL 10x PBS, 10 mL 1x PBS
60%ige, isotone Percoll-Lösung (15 mL)	9 mL Percoll, 1 mL 10x PBS, 5 mL 1x PBS
Aufbewahrungspuffer für Durchflusszytometrie- Proben	2% (v/v) FBS, 0,1% (v/v) Natriumazid, 0,2 mM EDTA, in PBS
ELISA-Blockingpuffer	10% (v/v) FBS in PBS
ELISA-Coatingpuffer	0,1 M Natriumkarbonatpuffer, pH 9,5 (85 mM NaHCO ₃ und 15 mM Na ₂ CO ₃), in A. dest.
ELISA-Substratlösung	1 TMB-Tablette in 10 mL ELISA-Substratpuffer aufgelöst
ELISA-Substratpuffer	0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 0,1 M Zitronensäure, in A. dest.
ELISA-Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween [®] 20 in PBS
Fixierungspuffer für Durchflusszytometrie	3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS
Laufmittel für Durchflusszytometer	0,02% (v/v) Na-Azid in PBS
MACS-Puffer	0,5% (v/v) Rinderalbumin, 1 mM EDTA, in PBS
Organlysepuffer (DNA-Isolierung)	100 mM Tris-HCl (aus einer 1 M Stammlösung pH 8), 5 mM EDTA (aus einer 0,5 M Stammlösung pH 8), 200 mM NaCl, 0,2% (v/v) SDS, 4% (v/v) Proteinase K, in A. dest.
Präparationsmedium	D-MEM mit 1% (v/v) P/S
R5-Medium	5% (v/v) FBS, 1% (v/v) P/S, in D-MEM
Tricin-gepufferte Saline (TBS)	0,85 g NaCl in 50 mL A. dest. lösen, Zugabe von 10 mL Tricin-Stammlösung; pH-Wert mit 1 M NaOH-Lösung auf 7,4 einstellen und mit A. dest. auf 100 mL auffüllen
Tricin-Stammlösung	100 mM Tricin in A. dest.
Waschpuffer für Durchflusszytometrie	5% (v/v) FBS in PBS

2.1.4 Primer und Sonden für LightCycler®-PCR

Tabelle 5: Verwendete Primer und Sonden

Name	Sequenz	Hersteller
Primer Tox9	5'-AGG AGA GAT ATC AGG ACT GTA G-3'	
Primer Tox10as	5'-GCG TCG TCT CGT CTA GAT CG-3'	TIB Molbiol, Berlin
Sonde HP1	5'-GAG TCG GAG AGG GAG AAG ATG TT-FAM-3'	
Sonde HP2	5'-RED640- CCG GCT TGG CTG CTT TTC CTG-Ph-3'	

2.1.5 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Einzelne Antikörper für ELISA	Produktnummer	Hersteller
Hamster anti-Maus MCP-1	18241D	Becton Dickinson GmbH
Hamster anti-Maus MCP-1-Biotin	18272D	Becton Dickinson GmbH
Primärantikörper für Durchflusszytometrie	Produktnummer	Hersteller
Anti-Maus-CD11b-FITC	553310	Becton Dickinson GmbH
Anti-Maus-CD11b-PE	557397	Becton Dickinson GmbH
Anti-Maus-CD11c-FITC	553801	Becton Dickinson GmbH
Anti-Maus-CD11c-PE	553802	Becton Dickinson GmbH
Anti-Maus-CD11c-APC	550261	Becton Dickinson GmbH
Anti-Maus-B220-PE	553089	Becton Dickinson GmbH
Anti-Maus-CD3-PerCP	553067	Becton Dickinson GmbH
Anti-Maus-CD54-PE	116107	Biologend, San Diego, Kalifornien, USA
Anti-Ratte-CD45-PE	MR6904	Invitrogen GmbH
Anti-Ratte-CD11b/c	MR6205	Invitrogen GmbH
Anti-Ratte-CD54-Biotin	202403	Biologend
Isotypen und Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie	Produktnummer	Hersteller
Ratte-IgG1-FITC	553995	Becton Dickinson GmbH
Ratte-IgG2a-PE	553930	Becton Dickinson GmbH
Ratte-IgG2b-PE	400607	Biologend
Armenischer Hamster-IgG1-FITC	553971	Becton Dickinson GmbH
Armenischer Hamster-IgG1-PE	554711	Becton Dickinson GmbH
Armenischer Hamster-IgG1-APC	553956	Becton Dickinson GmbH
Armenischer Hamster-IgG1-PerCP	553975	Becton Dickinson GmbH
Maus-IgG1-PE	MG104	Invitrogen GmbH
Maus-IgG2a-APC	MG2a05	Invitrogen GmbH
Streptavidin-PE	405203	Biologend
Primärantikörper für Fluoreszenzmikroskopie	Produktnummer	Hersteller
Kaninchen-IgG-anti-GFAP	G9269	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaninchen-Ig-anti-von-Willebrand-Faktor	A0082	DAKO, Glostrup, Dänemark
Kaninchen-Ig-anti-ZO-1	61-7300	Invitrogen GmbH
Kaninchen-Ig-anti-Claudin 5	34-1600	Invitrogen GmbH
Maus-IgG1-anti-Occludin	33-1500	Invitrogen GmbH
Sekundärantikörper für Fluoreszenzmikroskopie	Produktnummer	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Alexa Fluor 488	A11008	Invitrogen GmbH
Ziege-anti-Maus-IgG Alexa Fluor 488	A11001	Invitrogen GmbH
Ziege-anti-Maus-IgG-Alexa Fluor 633	A21050	Invitrogen GmbH
Huhn-anti-Kaninchen-IgG-Alexa Fluor 594	A21442	Invitrogen GmbH

2.1.6 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss GmbH, Jena
Diavert Auflichtmikroskop	Ernst Leitz, Wetzlar
Durchflusszytometer (FACSCalibur™)	Becton Dickinson GmbH
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf AG
Haemozytometer (nach Neubauer)	Assistent Glaswarenfabrik, Sondheim
Heraeus CO ₂ -Brutschrank	Thermo Electron, Oberhausen
Kryokonservierungsbehälter „Mister Frosty“	Nalgene® Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Kühlbare Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Electron, Oberhausen
LightCycler™	Roche Diagnostics GmbH
Schüttler (KM-2 Akku)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Tecan Spectra II	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Thermomixer Compact	Eppendorf AG
Ultrazentrifuge (mit Ti 60-Rotor), Optima™ LE80	Beckman Coulter Inc.
Wasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Widerstandsmessgerät (mit Elektroden), Millicell-Electrical Resistance System	Millipore, Bedford, USA

2.1.7 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	Hersteller
CellQuest Pro	Becton Dickinson GmbH
LightCycler™ Version 3.5	Roche Diagnostics GmbH
Tecan Spectra ELISA-Reader	Institut Virion/Serion GmbH, Würzburg
GraphPad InStat	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

2.1.8 Externe Dienstleistungen

Tabelle 9: Externe Dienstleistungen

Bezeichnung	Bestellnummer	Dienstleister
Agilent Whole Mouse Genome Microarray Service, 4×44K, One-Color (Microarray wird gestellt, inklusive RNA-Isolierung, RNA-Qualitätskontrolle, Amplifikation, Labeling, Hybridisierung, Erstellung von Rohdaten)	160-001-079	Miltenyi Biotec

2.1.9 Tiere

Tabelle 10: Verwendete Tierstämme

Tierstamm	Herkunft
BALB/c-Mäuse	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin
C57BL/6-Mäuse	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin
NMRI-Mäuse	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin
Wistar Han™-Ratten	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin

2.1.10 Zelllinien und *T. gondii*-Tachyzoiten für Zellkultureinsatz

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Herkunft
bEnd.3	Kim KS, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA
HFF	LGC Standards GmbH, Wesel
GFP ⁺ -Tachyzoiten des Typ I-Stammes RH von <i>T. gondii</i> (für Zellkultur)	Prof. Dr. Dominique Soldati-Favre, Institut für Mikrobiologie und Molekulare Medizin, Universität Genf, Schweiz
GFP ⁺ -Tachyzoiten des Typ II-Stammes ME49 von <i>T. gondii</i> (für Zellkultur)	Dr. Markus Meissner, Hygiene-Institut, Abteilung Parasitologie, Universität Heidelberg

2.2 Zellkulturarbeiten

2.2.1 Isolierung primärer Rattengliazellen

Zehn weibliche Wistar Han-Ratten (zwei bis drei Tage alt) wurden dekapitiert und die Köpfe mit 70%igem (v/v) Ethanol desinfiziert. In einer sterilen Werkbank wurden die Köpfe auf einem mit Alufolie umwickelten Styroporblock fixiert und die Kopfhaut mit einer Schere geöffnet. Die Schädel wurden mit einem Alkoholtupfer erneut desinfiziert und anschließend geöffnet. Die entnommenen Gehirne wurden in eiskalte PBS-Lösung überführt und unter einem Auflichtmikroskop mit Pinzetten von den Meningen und dem Plexus choroideus befreit. Bei 37 °C erfolgte für 15 Minuten der Verdau des homogenisierten Gehirngewebes in 15 mL einer 0,1%igen (v/v) Trypsinlösung in PBS. Nach dem Verdau wurde das Zentrifugenröhrchen mit Präparationsmedium (D-MEM mit 1% (v/v) P/S-Lösung) auf 50 mL aufgefüllt und für 10 Minuten bei 500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Da die durch den Verdau freigewordene DNA dem Pellet eine gelatinöse Konsistenz verleiht, wurde das Pellet in 5 mL DNaseI-Lösung (100 µg/mL DNaseI in Präparationsmedium) aufgenommen und für 5 Minuten auf- und abpipettiert. Die Zellen wurden zweimal mit Präparationsmedium gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur) und danach in Glia-Kulturmedium (D-MEM mit 10% FBS (v/v), 1% (v/v) P/S-Lösung) aufgenommen. Um Gliazellen für den Einsatz im Kokulturmodell zu erhalten, wurden die erhaltenen Zellen auf vier 12 Well-Platten verteilt, welche für die Kokultivierung mit Transwellfiltern geeignet waren. Die Gliazellen bildeten nach sieben Tagen eine konfluente Zellschicht aus und wurden ab dem 14. Tag nach Präparation für die Kokultivierung mit Endothelzellen eingesetzt. Die Zellen wurden

bis zu einem Zeitraum von drei Monaten nach Präparation für Kokulturversuche verwendet, der Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche.

2.2.2 Isolierung primärer Rattenhirnkapillarendothelzellen

Die Isolierung primärer Rattenhirnkapillarendothelzellen erfolgte gemäß einem Protokoll von Veszelka et al. [136]. Zehn weibliche Wistar Han-Ratten (zwei bis drei Wochen alt) wurden durch Inhalation von Isofluran narkotisiert. Nach Eintritt des Atemstillstandes wurde der Kopfbereich durch Eintauchen in 70%igen Ethanol (v/v) desinfiziert und die Tiere daraufhin dekapitiert. In einer sterilen Werkbank wurden die Köpfe auf einem mit Alufolie umwickelten Styroporblock fixiert und die Kopfhaut mit einer Schere geöffnet. Nach der Desinfektion des Schädels mit einem Alkoholtupfer wurde die Kalotte eröffnet und das Gehirn entnommen. Alle Gehirne wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in Präparationsmedium (D-MEM mit 1% (v/v) P/S-Lösung) gelagert. Mit Hilfe von sterilem Filterpapier wurden beide Hemisphären der Großhirnrinde von den Meningen befreit und mit einem Skalpell in 1 mm³ große Stücke zerteilt. Diese wurden daraufhin mit einer Pipette in 20 mL Collagenaselösung (1 mg/mL Collagenase 2, 15 µg/mL DNaseI) homogenisiert und einem 90-minütigen enzymatischen Aufschluß bei 37 °C auf einem Schüttler (200 rpm) unterzogen. Nach dem Verdau wurden 10 mL Präparationsmedium zu den Zellen gegeben und die Suspension für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1.000 x g zentrifugiert.

Zur Separation der Mikrokapillaren wurde das Zellpellet nach dem Collagenaseverdau in 25 mL einer 20%igen (w/v) BSA/D-MEM-Lösung aufgenommen und für 20 Minuten bei 4 °C und 1.000 x g zentrifugiert. Am oberen Rand der Zentrifugenröhre sammelte sich eine myelin- und neuronenhaltige Schicht an, die zusammen mit dem Überstand verworfen wurde. Um noch vorhandene Perizyten von der Basalmembran zu entfernen, wurde das Pellet mit 15 mL einer Collagenase/Dispase-Lösung für 60 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler (200 rpm) wiederum enzymatisch behandelt (1 mg/mL Collagenase/Dispase, 10 µg/mL DNaseI). Zu den Zellen wurden 10 mL Präparationsmedium gegeben und diese für 10 Minuten bei 700 x g und 4 °C zentrifugiert. Während des ersten Verdau war zur Herstellung eines Percollgradienten eine Lösung aus 10 mL Percoll (32,26% (v/v)), 19 mL PBS (61,3% (v/v)), 1 mL FBS (3,2% (v/v)) und 1 mL 10x PBS (3,2% (v/v)) vorbereitet, sterilfiltriert und in ein Ultrazentrifugengefäß überführt worden. Es folgte

eine einstündige Zentrifugation der Percolllösung bei circa $21.700 \times g$ (17.500 U/Minute in einem Type 60 Ti-Rotor) und $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Das Zellpellet wurde nach dem enzymatischen Verdau in 2 mL Präparationsmedium resuspendiert und nach Entnahme der obersten 2 mL des Percollgradienten vorsichtig über den Gradienten geschichtet. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei $1.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (ohne Bremse) konnte eine Schichtung der einzelnen Zellfraktionen erreicht werden, wobei die die Mikrokapillaren enthaltende Schicht direkt oberhalb der erythrozyten- und perizytenhaltigen Schicht zu finden war (Abbildung 6). Diese Zellen wurden mit einer Kanüle ($0,9 \times 70 \text{ mm}$) abgezogen und zweimal in Präparationsmedium gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei $1.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Das Pellet wurde anschließend in Endothelzellmedium (D-MEM mit 1% (v/v) P/S-Lösung, 20% (v/v) PDS, $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ Heparin, 1 ng/mL bFGF) mit Puromycin ($3 \text{ } \mu\text{g/mL}$) aufgenommen und auf beschichtete Transwell-Filter, Zellkulturschalen oder in Zellkulturflaschen ausgesät. Als Beschichtungslösung wurde ein Gemisch aus $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ Fibronectin und $500 \text{ } \mu\text{g/mL}$ Collagen IV in Aqua dest. eingesetzt. Kokulturfilter, Vertiefungen von Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen wurde mit der Lösung benetzt, für 2 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und in geöffnetem Zustand zum Trocknen in der sterilen Werkbank aufbewahrt. Der Proteinbiosynthesehemmer Puromycin unterstützt als Substrat der endothelspezifischen Effluxpumpe die Eliminierung kontaminierender Zellen [137]. Die Endothelzellen der Mikrokapillarfragmente organisieren sich während der ersten drei Tage in Kultur zu einer konfluenten Zellschicht auf der beschichteten Wachstumsoberfläche. Drei Tage nach Zugabe des Puromycins zu den isolierten Zellen wurde das Endothelzellmedium gewechselt und damit das Puromycin entfernt.



Abbildung 6: Zellschichtung einer Mikrokapillarpräparation nach Zentrifugation über den Percollgradienten.

2.2.3 Kokultivierung von Rattengliazellen und primären Rattenhirnkapillarendothelzellen

Nach der Präparation von primären Rattenhirnkapillarendothelzellen wurden diese in 12 mL Endothelzellmedium (D-MEM mit 1% (v/v) P/S-Lösung, 20% (v/v) PDS, 100 µg/mL Heparin, 1 ng/mL bFGF) mit Puromycin (3 µg/mL) aufgenommen und jeweils 0,5 mL der Zelllösung in das obere Kompartiment gecoateter Transwellfilter pipettiert. Das untere Kompartiment enthielt 1,5 mL des Mediums. Nach dreitägiger Kultur wurde das Medium der oberen Kompartimente durch Endothelzellmedium mit 200 nM Hydrocortison ersetzt [138]. Die Filtereinsätze wurden daraufhin in die Vertiefungen einer Gliakulturplatte umgesetzt, in welche zuvor ebenfalls 1,5 mL Endothelzellmedium mit 200 nM Hydrocortison vorgelegt worden war (Abbildung 7A). Am nächsten Tag wurde der Inhalt der oberen Kompartimente durch 0,5 mL eines Stimulationscocktails, bestehend aus Endothelzellmedium mit 200 nM Hydrocortison, 250 µM pCPT-cAMP sowie 17,5 µM Ro 20-1724 ausgetauscht. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung des transendothelialen Widerstandes der Zellschicht und die Filter wurden gegebenenfalls für Versuche eingesetzt.

2.2.4 Messung des transendothelialen Widerstandes bei Transwell-Filtern im Kokultursystem

Um eine gegebene Barriere dichte zu untersuchen, ist die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes – im Folgenden mit TEER abgekürzt - ein Mittel der Wahl [138]. Durch den Einsatz zweier Messelektroden im oberen bzw. unteren Kompartiment des Kokultursystems ist es möglich, den spezifischen Widerstand zu ermitteln, den die auf dem Filter wachsende Zellschicht darstellt (Abbildung 7B). Von diesem Wert muss der Leerwert subtrahiert werden, den man bei der Messung eines Filters ohne Zellen erhält. Die Einheit in der der transendotheliale Widerstand angegeben wird setzt sich zusammen aus dem gemessenen Widerstand (in Ω), multipliziert mit der Fläche des endothelialen Monolayers (in cm^2). Die Größe der Membranfläche ist dabei indirekt proportional zum Widerstand der Membran.

2.2.5 Permeabilitätsuntersuchungen bei Transwell-Filtern im Kokultursystem

Die Testlösung zur Permeabilitätsmessung beim in-vitro-Modells der BHS enthielt 1% (w/v) BSA in D-MEM ohne Phenolrot, 167,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Evans Blue-Farbstoff und 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Natriumfluoreszein [136]. Albumin (und der daran gebundene Farbstoff Evans Blue) gilt dabei als transzellulär penetrierender Marker, Fluoreszein als parazellulär penetrierender Marker. Für jeden zu messenden Filter wurden drei Wells in einer 12 Well-Platte mit je 1,5 mL D-MEM ohne Phenolrot befüllt und der entsprechende Filter eingesetzt. Bei jeder Messung wurde ein beschichteter Filter ohne Endothelzellen als Kontrolle mitgeführt. Der Inhalt des oberen Kompartimentes wurde durch 0,5 mL der Testlösung ersetzt und die Platte mit den Filtern auf einem Schüttler (150 rpm) bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert (Abbildung 7C). Nach 20 Minuten und 40 Minuten wurden die Filter jeweils vorsichtig in ein neues Well mit D-MEM ohne Phenolrot umgesetzt. Nach 60 Minuten wurden die Filter verworfen und 100 μL des unteren Kompartiments in einem ELISA-Reader (620 nm, für Evans Blue-Albumin) bzw. einem Fluoreszenzreader (514 nm, für Natriumfluoreszein) vermessen. Zusätzlich wurde die Testlösung zur Erstellung einer Kalibriergeraden mit Hilfe einer geometrischen Verdünnungsreihe verdünnt.

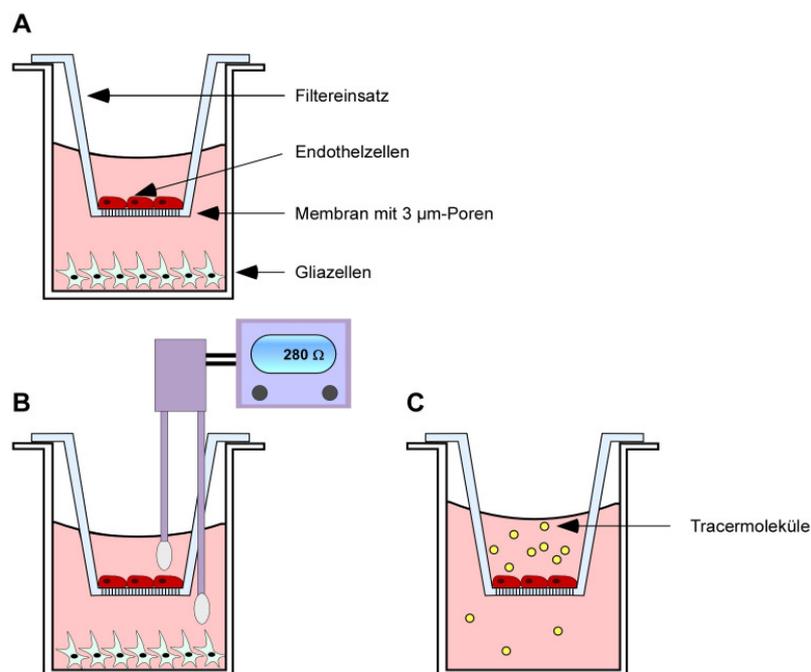


Abbildung 7: In-vitro-Kokulturmodell der Blut-Hirn-Schranke. (A) Kokultivierung von primären Rattenhirnkapillarendothelzellen mit primären Rattengliazellen. (B) Bestimmung des transendothelialen Widerstandes im Kokultursystem. (C) Bestimmung des endothelialen Permeabilitätskoeffizienten P_e im Kokultursystem unter Verwendung der Tracermoleküle Natriumfluoreszein und Evans Blue-Albumin.

Zur Untersuchung und zum Vergleich der Barrierequalität wurde ein endothelialer Permeabilitätskoeffizient (Pe) berechnet [138]. Dafür muss zuerst eine Clearance-Rate (in $\mu\text{L}/\text{Minute}$) bestimmt werden. Die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten wurde mit den folgenden Formeln durchgeführt, wobei sich der Begriff luminal auf das obere Kompartiment und der Begriff abluminal auf das untere Kompartiment bezieht. Dies wird im Folgenden am Beispiel von Evans Blue-Albumin dargestellt (167.000 ng/mL Evans Blue und 0,1% Albumin im oberen Kompartiment).

$Konz_{(abl)}$:	Stoffkonzentration im abluminalen Kompartiment
$Konz_{(lum)}$:	Stoffkonzentration im luminalen Kompartiment
$AbsMenge_{(lum)}$:	Absolutmenge des Stoffes im luminalen Kompartiment
$V_{(abl)}$:	Flüssigkeitsvolumen im abluminalen Kompartiment (hier: 1,5 mL)
$V_{(lum)}$:	Flüssigkeitsvolumen im luminalen Kompartiment (hier: 0,5 mL)
Pe :	Permeabilitätskoeffizient (cm/s)
PS :	Steigung ($\mu\text{L}/\text{Min}$)
A :	Filterfläche (cm^2)

1. Berechnung der abluminalen Stoffkonzentration für jeden Messpunkt

$Konz_{(abl)}$ —► Berechnung über Kalibriergerade

2. Berechnung der absoluten luminalen Stoffmenge für jeden Messpunkt

$$\begin{aligned}
 AbsMenge_{(lum) 20 \text{ Min}} &= (V_{(lum)} \times 167.000 \text{ ng/mL}) - (V_{(abl)} \times Konz_{(abl)}) \\
 AbsMenge_{(lum) 40 \text{ Min}} &= (V_{(lum)} \times 167.000 \text{ ng/mL}) - (V_{(abl)} \times (Konz_{(abl) 20 \text{ Min}} + Konz_{(abl) 40 \text{ Min}})) \\
 AbsMenge_{(lum) 60 \text{ Min}} &= (V_{(lum)} \times 167.000 \text{ ng/mL}) - (V_{(abl)} \times (Konz_{(abl) 20 \text{ Min}} + Konz_{(abl) 40 \text{ Min}} + Konz_{(abl) 60 \text{ Min}}))
 \end{aligned}$$

3. Berechnung der luminalen Stoffkonzentration für jeden Messpunkt

$$\begin{aligned}
 Konz_{(lum) 20 \text{ Min}} &= AbsMenge_{(lum) 20 \text{ Min}} \times 2 \text{ (in ng/mL)} \\
 Konz_{(lum) 40 \text{ Min}} &= AbsMenge_{(lum) 40 \text{ Min}} \times 2 \text{ (in ng/mL)} \\
 Konz_{(lum) 60 \text{ Min}} &= AbsMenge_{(lum) 60 \text{ Min}} \times 2 \text{ (in ng/mL)}
 \end{aligned}$$

4. Berechnung der Clearance für jeden Messpunkt

$$\text{Clearance} = \frac{\text{Konz}_{(\text{abl})} \times V_{(\text{abl})}}{\text{Konz}_{(\text{lum})}}$$

$$\text{Clearance}_{20 \text{ Minuten}} = \frac{\text{Konz}_{(\text{abl}) 20 \text{ min}} \times V_{(\text{abl}) 20 \text{ min}}}{\text{Konz}_{(\text{lum}) 20 \text{ min}}}$$

$$\text{Clearance}_{40 \text{ Minuten}} = \text{Clearance}_{20 \text{ Minuten}} + \frac{\text{Konz}_{(\text{abl}) 40 \text{ min}} \times V_{(\text{abl}) 40 \text{ min}}}{\text{Konz}_{(\text{lum}) 40 \text{ min}}}$$

$$\text{Clearance}_{60 \text{ Minuten}} = \text{Clearance}_{20 \text{ Minuten}} + \text{Clearance}_{40 \text{ Minuten}} + \frac{\text{Konz}_{(\text{abl}) 60 \text{ min}} \times V_{(\text{abl}) 60 \text{ min}}}{\text{Konz}_{(\text{lum}) 60 \text{ min}}}$$

Nun kann die Clearance für den Filter mit Endothelzellen bzw. den Filter ohne Endothelzellen gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung (PS) berechnet werden (entspricht Clearance-Rate in $\mu\text{L}/\text{Minute}$).

Um die Barrierekapazität des Leerfilters allein herauszurechnen wird folgende Formel angewandt:

$$\frac{1}{\text{PS}_{\text{Endothel}}} = \frac{1}{\text{PS}_{\text{Filter mit Zellen}}} - \frac{1}{\text{PS}_{\text{leerer Filter}}} \quad (\text{PS in } 1/\text{mL}/\text{min}; \text{ mL}/\text{min} = 10^{-6} \text{ m}^3/\text{min})$$

Der Permeabilitätskoeffizient (P_e) errechnet sich aus dem Quotienten des Wertes für $\text{PS}_{\text{Endothel}}$ und der Fläche des Filters. Die Einheit des Koeffizienten ist cm/s , da

$$10^{-6} \frac{\text{m}^3}{\text{min} \cdot \text{cm}^2} = 10^{-6} \frac{\text{m}^3}{\text{min} \times \text{cm}^2} = 10^{-6} \frac{\text{m}^3}{\text{min} \times 10^{-4} \text{ m}^2} = 10^{-2} \frac{\text{m}}{\text{min}} = 1 \frac{\text{cm}}{60 \text{ s}}$$

2.2.6 Migrationsassay mit Transwell-Filtern im Kokultursystem

Das in-vitro-Kokulturmodell diente zur Untersuchung des Migrationsverhaltens mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) über die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Die Transwellfilter mit den Endothelzellen, welche sich bis zu diesem Zeitpunkt in Kokultur mit den Gliazellen befanden und für 24 Stunden mit einem Cocktail aus Hydrocortison, pCPT-cAMP und Ro 20-1724 stimuliert worden waren, wurden in die Vertiefungen einer neuen 12-Well-Platte umgesetzt. In das obere Kompartiment jedes Transwellfilters wurden in einem Volumen von $300 \mu\text{L}$ Kulturmedium 3×10^5 PBMCs der jeweiligen Kondition zugegeben. Das untere Kompartiment enthielt in einem Volumen von 1 mL entweder Kulturmedium allein oder Kulturmedium mit Zytokinen (TNF α , MCP-1). Die dreistündige Inkubation der

PBMCs mit den Endothelzellen erfolgte wiederum bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre. Die PBMCs, welche während der Inkubation über die endotheliale Barriere in das untere Kompartiment gewandert waren, wurden mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie analysiert.

Für jede Kondition wurden 8 bis 12 Filter eingesetzt und die migrierten Zellen daraus vereinigt. Dafür wurde die Unterseite der Filter mit eiskaltem PBS abgespült und zusammen mit dem Inhalt der Vertiefungen in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Vertiefungen selbst wurden zusätzlich zwei Mal mit 1 mL eiskaltem PBS gespült und die Waschlösung in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 500 x g und 4 °C konnten die Zellen des Pellets mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die Durchflusszytometrie weiterbehandelt werden.

2.2.7 Kultivierung von Zelllinien

Für die in-vitro-Untersuchungen zur Neuroinvasion durch *T. gondii* wurden unter anderem Maushirnendothelzellen (bEnd.3-Zellen) und humane Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen) eingesetzt [139, 140].

Beide Zelllinien wurden in D-MEM mit 10% (v/v) FBS und 1% (v/v) P/S-Lösung bei 37 °C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt und die Zellen jeweils bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert.

Zum Passagieren der Zelllinien wurden konfluente Zellen einem Trypsinverdau unterzogen und mit einer Ratio von 1:5 auf neue Kulturgefäße aufgeteilt. Alle Zelllinien wurden bis zur 30. bzw. 40. Passage verwendet.

2.2.8 Passagieren von Zelllinien

Um konfluent gewachsene Zellen zu passagieren wurde die Zellschicht vorsichtig mit PBS abgespült und mit soviel 1x-Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% (v/v) Trypsin, 0,02% (v/v) EDTA, in PBS) inkubiert, dass die Zellschicht gerade bedeckt war. Nach dem Ablösen der Zellen von der Wachstumsfläche wurden diese in Kulturmedium (D-MEM mit 10% (v/v) FBS und 1% (v/v) P/S-Lösung) überführt und für 10 Minuten bei 350 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und

die Zellen mit einer Ratio von 1:5 auf neue Kulturgefäße verteilt. Alle Reagenzien zur Zellpassage wurden vor Beginn der Arbeiten auf 37 °C erwärmt.

2.2.9 Kultivierung von *T. gondii*-Tachyzoiten

T. gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit und muss daher in Wirtszellen vermehrt werden. Ein Aliquot (circa 0,5 mL) einer extrazellulären Tachyzoitenkultur (Typ I-Stamm RH bzw. Typ II-Stamm ME49) wurde jeweils zur Infektion neuer HFF-Zellen genutzt. Nach zwei bis drei Tagen erfolgte die Lyse der Wirtszellen durch die sich vermehrenden Parasiten. Die extrazellulären Tachyzoiten wurden am Tag der Wirtszellyse für Experimente eingesetzt oder sofort weiterpassagiert, da ein Überleben der Parasiten außerhalb von Wirtszellen nur kurzfristig möglich ist.

2.2.10 Infektion von Zellen mit *T. gondii*-Tachyzoiten

Für alle Infektionen wurden *T. gondii*-Tachyzoiten aus einer frisch lysierten HFF-Kultur eingesetzt. Der Inhalt der Kulturflasche wurde zuerst für 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert, um noch vorhandene Wirtszellen zu pelletieren. Der Überstand wurde bei 350 x g für 10 Minuten zentrifugiert und die im Pellet enthaltenen Tachyzoiten wurden vor einem weiteren Waschschrift bei 350 x g (10 Minuten) in Kulturmedium (D-MEM mit 1% P/S-Lösung und 10% FBS) bzw. PBS resuspendiert. Die gewaschenen Tachyzoiten wurden in einer geeigneten Menge Kulturmedium oder PBS aufgenommen, gezählt und zeitnah für Folgeversuche eingesetzt.

2.2.10.1 Infektion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

5×10^6 bis 10^7 PBMCs aus Maus- bzw. Rattenblut wurden in einer Ratio zwischen 1:1 und 5:1 mit *T. gondii*-Tachyzoiten in 15 mL D-MEM mit 1% P/S-Lösung und 10% FBS aufgenommen und in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit angeschraubtem Deckel und in Schräglage bei 37 °C und 5% CO₂ für 2 Stunden inkubiert, sofern nicht anders angegeben. Kontrollzellen ohne Toxoplasmen wurden bei gleichen Bedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen extrazellulären Tachyzoiten wurde verworfen und das Pellet in

weiteren 15 mL Medium suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten bei 200 x g und Raumtemperatur) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 3 mL Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.10.2 Infektion von Endothelzellen

Primäre Rattenhirnkapillarendothelzellen sowie bEnd.3 Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert und für Versuche mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/cm² (5×10^5 Zellen pro Well) in 24-Well-Platten ausgesät. Bei Bedarf erfolgte eine 48-stündige Vorinkubation mit 100 U/mL rekombinantem Maus- bzw. Ratten-IFN γ . Die Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten erfolgte in einer Ratio von 5:1 bzw. 1:1 für 2 Stunden, gefolgt von 2 Waschschritten mit warmem PBS und gegebenenfalls einer Weiterkultivierung der Zellen. Da Endothelzellen nach Infektion mit *T. gondii* im Durchflusszytometer als GFP⁺ erscheinen, war es möglich, zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen desselben Wells zu unterscheiden. Dementsprechend werden diese Populationen im Folgenden als *T. gondii*-behandelt aber nicht infiziert bzw. als *T. gondii*-behandelt und infiziert bezeichnet.

Für die Genexpressionsanalysen wurden bEnd.3-Zellen in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser (56,7 cm² Wachstumsfläche) in einer Dichte von 6×10^4 Zellen/cm² ausgesät und am nächsten Tag mit Tachyzoiten in einer Ratio von 3:1 für 4 bzw. 8 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA-Lösung von den Platten abgelöst, mit Medium (D-MEM mit 10% FBS) gewaschen und das Pellet anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Versand an die Firma Miltenyi Biotech (auf Trockeneis) wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.11 Kryokonservierung und Regeneration von Zelllinien und *T. gondii*-Tachyzoiten

Die einzufrierenden Zellen wurden zunächst mit dem jeweiligen Kulturmedium gewaschen und anschließend gezählt. Als Kryokonservierungsreagenz wurde DMSO verwendet, welches in einer Konzentration von 10% (v/v) in fötalem Rinderserum vorlag. Das Einfriermedium wurde bei Raumtemperatur eingesetzt. Es wurden 10^6 bis 10^7 Zellen in einem Volumen von 1,5 mL aufgenommen und mit einer Kühlrate von 1 °C pro Minute eingefroren. Dafür wurden die Kryogefäße mit den Zellen in einen Kryokonservierungsbehälter überführt und dieser über Nacht bei -80 °C

belassen. Die Proben wurden anschließend in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C dauerhaft gelagert.

Zur Regeneration kryokonservierter Zellen wurde der Inhalt des Kryogefäßes in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in eine Zentrifugenröhre mit 50 mL warmem Kulturmedium überführt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen und die Zellen des Pellets mit frischem Medium in Kultur genommen.

2.3 Isolierung von PBMCs und mononukleären Zellen des Gehirns durch Dichtegradientenzentrifugation

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) von Versuchstieren wurden mittels OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Bei OptiPrep™ handelt es sich um eine 60%ige (w/v) Iodixanol-Lösung (Lösungsmittel ist Wasser) mit einer Dichte von 1,32 g/mL. Für die Dichtegradientenzentrifugation wird das gewonnene Vollblut mit OptiPrep™ und einem Tricin-Puffer (TBS-Puffer) versetzt, um so die Dichte der erhaltenen Lösung auf 1,078 g/mL einzustellen. Nach einer sich anschließenden Zentrifugation „flotieren“ die Zielzellen an die Oberfläche des Gradienten bzw. der OptiPrep™-Plasma-Phase, da die Zelldichte geringer als die der umgebenden Lösung ist [141]. Erythrozyten sowie Granulozyten werden sedimentiert.

2.3.1 Isolierung von PBMCs aus Mäuseblut

Für die Gewinnung von Vollblut wurden die Versuchstiere zuerst mit CO₂ anästhesiert und das Blut durch Herzpunktion entnommen (0,8 mL – 1,2 mL pro Maus). Die verwendeten Spritzen wurden vor der Blutentnahme mit Heparin als Antikoagulans behandelt. Zur Isolierung von murinen PBMCs wurden 5 mL bis 7 mL heparinisiertes Blut mit ½ Blutvolumen TBS-Puffer versetzt und anschließend mit ¼ Blutvolumen OptiPrep™-Lösung vermischt. Alle Komponenten des Gradienten hatten Raumtemperatur. Nach dem Überführen des Gemisches in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen wurde dieses mit 0,5 mL TBS-Puffer überschichtet und anschließend für 30 Minuten bei 1.000 x g sowie Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überschichtung des Gradienten mit TBS-Puffer verhindert, dass sich die PBMCs auf Höhe des Meniskus an die Gefäßwand anheften und erleichtert so die spätere

Entnahme der Zellen. Die PBMCs befinden sich nach der Zentrifugation hauptsächlich in einer weißen Interphase zwischen der TBS-Puffer-Überschichtung und der OptiPrep™-Plasma-Phase, d. h., sie flotieren auf der Oberfläche des Gradienten (Abbildung 8). Der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wird vom Meniskus abwärts bis 0,5 cm über dem Erythrozytenpellet abgenommen. Die so erhaltene Zellfraktion wird in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt, mit PBS auf 50 mL aufgefüllt und gewaschen (Zentrifugation bei 250 x g, 10 Minuten, 4 °C), um verbliebene Blutplättchen zu entfernen. Durch eine sich anschließende Erythrozytenlyse können eventuell vorhandene Erythrozyten eliminiert werden. Hierfür wird das Zellpellet in 5 mL einer hypotonen, 0,2%igen (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert und 20 Sekunden inkubiert. Danach wird das gleiche Volumen 1,6%iger (w/v) NaCl-Lösung zugegeben, um wieder isotone Bedingungen herzustellen. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten und 4 °C können die isolierten PBMCs sofort für Versuche verwendet werden. Sollten die Zellen über Nacht bei 4 °C gelagert werden, so wurde R5-Medium zum Pellet hinzugegeben.

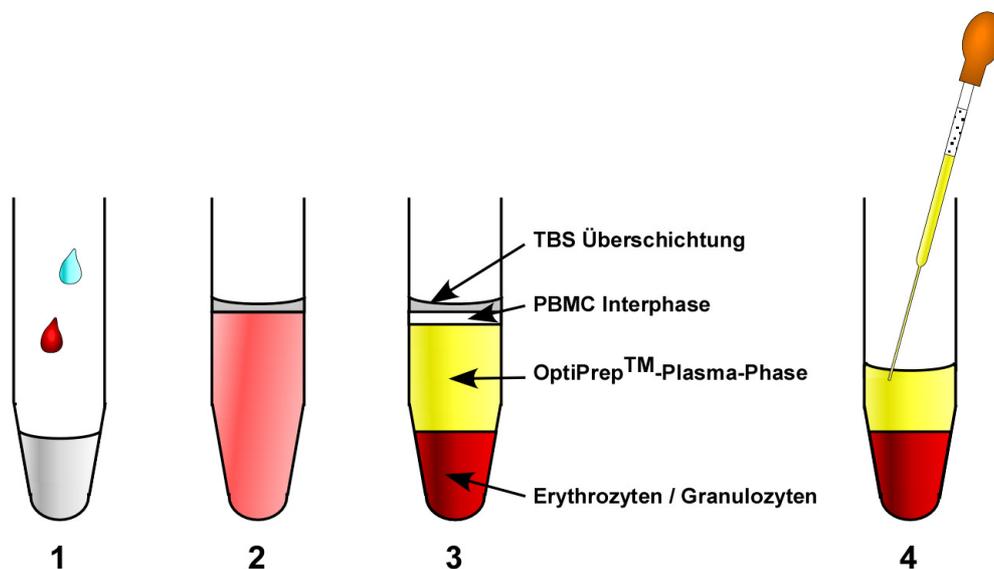


Abbildung 8: PBMC-Isolierung aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation. (1) Vollblut wird mit OptiPrep™ und TBS-Puffer gemischt und (2) mit TBS-Puffer überschichtet. (3) Nach der Zentrifugation sind Erythrozyten sowie Granulozyten sedimentiert, die PBMCs befinden sich hauptsächlich in der weißen Interphase unterhalb des Meniskus. (4) Vom Meniskus aus abwärts werden die PBMCs aus der Interphase und der OptiPrep™-Plasma-Phase gewonnen.

2.3.2 Isolierung von PBMCs aus Rattenblut

Für die Isolierung von Ratten-PBMCs wurden die Versuchstiere mit CO₂ anästhesiert und das Blut durch Herzpunktion entnommen (ca. 10 mL pro Ratte). Die verwendeten Spritzen wurden vor der Blutentnahme mit Heparin als Antikoagulans behandelt. Das heparinisierte Blut wurde mit 1/8 Blutvolumen OptiPrep™-Lösung versetzt (z. B. 5 mL Blut und 0,625 mL OptiPrep™-Lösung) und die entstandene Lösung durch Inversion des Reaktionsgefäßes vorsichtig vermengt. Das Blut-OptiPrep™-Gemisch wird wiederum in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,5 mL TBS-Puffer überschichtet. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und 1.300 x g entspricht die weitere Vorgehensweise der der Isolierung von murinen PBMCs.

2.3.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Gehirn

Die mit Isofluran getöteten Tiere wurden mit 40 mL eiskaltem PBS durch die linke Herzkammer perfundiert. Jeweils zwei Gehirne wurden gemeinsam mit Hilfe einer 18G-Kanüle in 5 mL RPMI 1640-Medium homogenisiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 250 µg/mL Collagenase/Dispase und 125 µg/mL DNase I für eine Stunde bei 37 °C einem Verdau unterzogen. Nach der Inkubation wurde die Suspension durch ein Zellsieb mit 70 µm Porengröße in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen filtriert, mit RPMI 1640-Medium auf 50 mL aufgefüllt und für 10 Minuten bei 1.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in einer 60%igen (v/v) Percoll-Lösung aufgenommen und vorsichtig mit einer 30%igen (v/v) Percoll-Lösung überschichtet. Zur Separation der einzelnen Fraktionen wurde der Gradient für 25 Minuten bei 1.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die am oberen Rand des Gradienten befindliche Myelinschicht wurde verworfen. Aus der Interphase zwischen der 30- und 60%igen Percoll-Lösung wurden die mononukleären Zellen entnommen und in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einem letzten Waschschrift mit RPMI 1640-Medium (10 Minuten, 500 x g, Raumtemperatur) wurden die Zellen in 2 mL RPMI 1640-Medium mit 1% P/S-Lösung und 10% FBS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.4 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation wurde angewandt, um eine murine PBMC-Population in eine mit CD11b⁺-Zellen angereicherte und eine CD11b⁻-negative Fraktion aufzutrennen. Die Separation von Zellpopulationen erfolgte mit Hilfe sogenannter „Microbeads“. Dabei handelt es sich um Antikörper, die an einen spezifischen Oberflächenmarker der Zellpopulation von Interesse binden und mit magnetisierbaren Partikeln konjugiert sind. Die Gesamtzellsuspension wird auf eine magnetisierte Säule geladen, wobei nur die zuvor markierten Zielzellen in der Säule zurückgehalten werden. Nach Wegnahme der magnetisierenden Umgebung können die in der Säule verbliebenen Zellen ebenfalls eluiert werden.

Zur Isolierung von CD11b⁺-Zellen wurden 10^7 bis 5×10^7 PBMCs eingesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten soweit möglich auf Eis und mit gekühlten Lösungen. Die Zellen wurden in einem 15 mL-Zentrifugenröhrchen zuerst mit 10 mL MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 300 x g) und in 90 µL MACS-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µL der anti-CD11b-„Microbeads“-Lösung pro 10^7 Zellen erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C im Dunkeln. Daraufhin wurden die Zellen drei Mal mit je 10 mL MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 300 x g) und das Pellet in 500 µL MACS-Puffer aufgenommen. Zur Äquilibration wurde die Separationssäule in eine magnetische Halterung eingespannt, mit 500 µL MACS-Puffer gewaschen und mit den markierten Zellen beladen. Beim Eluat der Säule handelt es sich um die CD11b⁻-Zellfraktion. Die Säule wurde drei Mal mit je 500 µL MACS-Puffer gewaschen und auch diese Durchflüsse wurden mit der Negativfraktion vereinigt. Die Säule wurde nun aus der Halterung entnommen und mit 1 mL MACS-Puffer beschickt. Mit Hilfe eines Stempels konnte die CD11b⁺-Fraktion von der Säule eluiert werden. Um den Reinheitsgehalt der Positivfraktion zu erhöhen, wurde diese ein zweites Mal auf eine äquilibrierte Säule gegeben und wie beschrieben gewaschen und eluiert. Nach Zentrifugation (10 Minuten bei 4 °C und 300 x g) der erhaltenen Zellfraktionen wurde das Pellet in 2 mL PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben bei der CD11b⁺-angereicherten Fraktion eine Reinheit von circa 85% (im Folgenden als CD11b⁺-Fraktion bezeichnet). Die restlichen Zellen enthielten maximal 6% CD11b⁺-Zellen (im Folgenden als CD11b⁻-Fraktion bezeichnet).

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1 DNA-Isolierung aus Gewebe

Zur Isolierung von Gesamt-DNA aus Organen wurden diese zuerst einem proteolytischen Verdau mit Proteinase K unterzogen. Kleine Organstücke von der Leber bzw. die Hälfte eines Gehirns wurden dafür in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen mit 0,5 bzw. 1 mL Organ-Lysepuffer versetzt und bei 56 °C auf einem Schüttler inkubiert, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hatte. Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 30 Minuten bei 20.000 x g, sodass nichtlösliche Zellbestandteile abgetrennt werden konnten. 400 µL bzw. 800 µL des Überstandes wurden mit dem gleichen Volumen an 100%igem Isopropanol versetzt und der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Die präzipitierte DNA konnte mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze aus der Lösung „gefischt“, in 70%igen (v/v) Ethanol eingetaucht und dann in einem weiteren Reaktionsgefäß bis zum vollständigen Trocknen aufbewahrt werden. Die getrocknete DNA wurde im Anschluss durch Zugabe von 200 bis 500 µL A. dest. wieder gelöst. Der DNA-Isolierung aus Gehirngewebe schloss sich zusätzlich eine DNA-Aufreinigung durch DNA-bindende Säulen an. Vor der weiteren Verwendung wurden die DNA-haltigen Lösungen einer Konzentrationsbestimmung unterzogen. Hierbei wurde neben der DNA-Konzentration der Lösung auch der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (doppelsträngige DNA) und 280 nm (Proteine) berechnet. Ein Quotient zwischen 1,7 und 1,9 zeigte einen ausreichenden Reinheitsgehalt der DNA-Probe an.

2.5.2 DNA-Aufreinigung über DNA-bindende-Säulen

Wurde die DNA aus einer kompletten Hirnhälfte isoliert, so erfolgte zusätzlich eine Aufreinigung der DNA über DNA-bindende Säulen. Dies geschah unter Zuhilfenahme des DNeasy Blood & Tissue Mini Kits und einem dafür ausgelegten Aufreinigungsprotokoll. Alle Aufreinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Dafür wurden 150 µL der aufzureinigenden DNA (jeweils 300 – 600 µg) mit 15 µL Puffer AW1 und 375 µL Puffer AW2 versetzt. Die Proben wurden mit einem Vortexgerät für 10 Sekunden gemischt und anschließend auf die vorbereiteten Säulen geladen. Nach einer Zentrifugation für 60 Sekunden bei 6.000 x g wurde das Auffangröhrchen verworfen und die Säule in einem neuen Auffanggefäß platziert. Zur

Säule wurden nun 500 µL Puffer 2 zugegeben und diese erneut für 60 Sekunden bei 6.000 x g zentrifugiert. Das Auffangröhrchen wurde danach verworfen und die Säule in ein neues Röhrchen umgesetzt. Es folgte eine Zentrifugation für drei Minuten bei 20.000 x g, um die Membran der Säule zu trocknen. Die Säule wurde anschließend in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß umgesetzt und die Membran mit 100 µL A. dest. überschichtet. Nach einer Inkubation von 60 Sekunden wurde die DNA durch Zentrifugation (1 Minute bei 20.000 x g) von der Säule in das Reaktionsgefäß eluiert. Für die aufgereinigte DNA-Lösung wurde wiederum eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

2.5.3 Quantitative LightCycler™-Polymerase-Ketten-Reaktion (qLC-PCR)

Neben dem LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes-Kit wurden zwei fluoreszierende Sonden und die Primer Tox9 und Tox10as eingesetzt, welche ein 162 Basenpaare großes Fragment des „cryptic“-Gens von *T. gondii* flankieren [142]. Die Sonde HP1 (Donor) besitzt eine 3'-terminale Fluoreszein-Markierung (FAM), die Sonde HP2 (Akzeptor) trägt eine 5'-terminale „LightCycler®-Red-640“-Markierung und am 3'-Ende eine Phosphatgruppe. Die Sequenzen der Sonden wurden so gewählt, dass diese sich nach korrekter Hybridisierung in räumlicher Nähe zueinander befinden. Nach Anregung des Donorfarbstoffes durch eine externe Lichtquelle wird der emittierte Lichtstrahl des Donor-Fluorophors auf das Akzeptor-Fluorophor übertragen. Dieses wiederum wird zur Emission eines Lichtstrahls bestimmter Wellenlänge angeregt, welcher vom Detektor gemessen wird. Der Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren wird als Fluorescence Energy Resonance Transfer (FRET) bezeichnet. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Menge an entstandenem PCR-Produkt.

Zur Amplifikation der toxoplasmaspezifischen DNA wurde folgender „Mastermix“ vorbereitet:

Tabelle 12: „Mastermix“ für qLC-PCR

Reagenzien (Stammlösungen)	Volumen für eine Messung (Σ 5 µL)	Mastermix- Konzentration in 5 µL
FastStart Polymerase	1 µL	
A. dest.	0,86 µL	
Primer Mix (Tox9 und Tox10as, je 10 mM)	1 µL	2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	0,8 µL	4 mM
Sonde HP1 (3 µM)	0,67 µL	0,4 µM
Sonde HP2 (3 µM)	0,67	0,4 µM

In die Reaktionskapillaren wurden 5 μL des „Mastermixes“ vorgelegt und anschließend mit 5 μL der zu messenden Probe vermischt. Die Menge an eingesetzter Gesamt-DNA variierte dabei zwischen 50 pg und 250 ng, wobei die Proben einer Messung immer auf die gleiche Konzentration eingestellt wurden. Als interne Kontrolle dienten drei Standardansätze mit 2,5 pg, 25 pg und 250 pg Toxoplasma-DNA. Die Auswertung der Proben erfolgte schließlich in Picogramm Toxoplasma-DNA pro Nanogramm eingesetzter Gesamt-DNA. Ein Ansatz, der neben dem „Mastermix“ nur Wasser enthielt, diente als Negativkontrolle. Vor der Messung wurden die Kapillaren kurz an zentrifugiert, um das Reaktionsgemisch am Boden der Kapillare zu sammeln. Die PCR beinhaltete eine initiale Denaturierung für 10 Minuten bei 95 °C und 50 Zyklen mit 10 Sekunden bei 95 °C, 20 Sekunden bei 52 °C und 30 Sekunden bei 72 °C und zum Abschluss einen Zyklus für 30 Sekunden bei 40 °C. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der LighCycler[®] Data Analysis Software 3.5.

2.5.4 Genexpressionsanalyse bei Endothelzellen mittels Microarray-Technik

Veränderungen im Transkriptionsprofil infizierter bEnd.3-Zellen wurden mittels Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarrays untersucht. Die Endothelzellen wurden mit einer Ratio von 3:1 infiziert und für 4 bzw. 8 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die weitere Probenaufarbeitung wie RNA-Amplifikation, RNA-Qualitätskontrolle, T7-basierte Amplifikation, sowie Hybridisierung der RNA und die Datenanalyse wurden vom Gene Expression Profiling Service der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) durchgeführt.

2.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Speziell beschichtete und verschließbare 96-Well-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit 50 μL einer Capture-Antikörperlösung inkubiert (Verdünnung jeweils entsprechend den chargenspezifischen Angaben des Herstellers (in Coating-Puffer)). Am nächsten Tag wurden die Wells der Platte dreimalig mit Waschpuffer gespült und nach dem letzten Waschschrift kräftig ausgeklopft, um allen Puffer zu entfernen. Um unspezifische Bindungen abzusättigen erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur eine Blockierung mit 10% (v/v) FBS in PBS. Währenddessen wurde ausgehend von der Ausgangslösung des Standards (2.000 pg/mL) mit 1:2-Verdünnungen in Blockierungspuffer (bis zu 62,5 pg/mL) eine Kalibrierreihe vorbereitet. Die Platte

wurde nach dem Blockierschritt erneut zweimal mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft, bevor jeweils 50 μL der Standardlösungen und der bei Bedarf in Blockierungspuffer verdünnten Proben aufgetragen wurden. Die Platte wurde erneut verschlossen für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 5 Waschschriffe nach der Inkubation wurden ungebundene Überstände entfernt. Nach dem Ausklopfen der Platte wurden pro Well 50 μL des Detektionsgemisches zugegeben, bestehend aus einer chargenspezifischen Verdünnung des Detektionsantikörpers und der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase in Blockierungspuffer. Der sich anschließenden einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgten 7 Waschschriffe mit Waschpuffer, wobei jeder Waschschrift eine einminütige Inkubationszeit beinhaltete. Nach dem Ausklopfen der Platte wurden 50 μL Substratlösung zugegeben (1 TMB-Tablette in 10 mL ELISA-Substratpuffer gelöst) und die Platte bis zu einer sichtbaren Blaufärbung der Lösung im Dunkeln aufbewahrt. Die Zugabe von 2 M Schwefelsäure stoppte die Umsetzung des Substrates TMB durch die Peroxidase und ließ die Lösung gelblich erscheinen. Die Vermessung der Proben erfolgte photometrisch bei 450 nm ohne Referenz.

2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Um Oberflächenmoleküle auf Endothelzellen und Gliazellen darzustellen, wurden diese auf Collagen-G-beschichteten Glasplättchen (Coverslips) (1 mg Collagen G/mL) in einer 24 Well-Platte ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Durch eine 15-minütige Inkubation mit 3,7% (v/v) Formaldehydlösung in PBS wurden die Zelllayer fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindestellen zu blockieren erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 5% (v/v) fötalem bovines Serum oder Ziegenserum in PBS bei Raumtemperatur. Die entsprechenden Primärantikörper wurden in Blockierlösung auf eine Konzentration von 5 bis 10 $\mu\text{g/mL}$ verdünnt und anschließend für 60 Minuten zu den Zellen gegeben. Nach zwei Waschschriffen mit PBS erfolgte die Zugabe der in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper (1:100) und eine weitere Inkubation für 60 Minuten im Dunkeln. Die Zelllayer wurden nach erfolgter Inkubation erneut zweimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten im Dunkeln mit DAPI/Methanol-Lösung inkubiert (0,1 $\mu\text{g/mL}$). Überschüssige DAPI-Lösung wurde daraufhin durch einen Waschschrift mit Methanol entfernt und die Coverslips wurden nach dem

Trocken mit Eindeckmedium auf Objektträgern fixiert (Zellschicht auf Seite des Objektträgers). Die Bildaufnahmen erfolgten an einem 200M Axiovert Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss. Die verwendeten Antikörperkombinationen lassen sich aus Tabelle 13 entnehmen.

Tabelle 13: Antikörper zur Charakterisierung primärer Zellen durch Immunfluoreszenz-Färbung

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Kaninchen-IgG-anti-GFAP	Ziege-anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor 488
Kaninchen-Ig-anti-von-Willebrand-Faktor	Ziege-anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor 488
Kaninchen-Ig-anti-ZO-1	Huhn-anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor 594
Maus-IgG1-anti-Occludin	Anti-Mouse-Cy3

2.8 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen erfolgten an einem FACS-Calibur™ der Firma Becton Dickinson, welches durch den Einsatz von zwei Lasern die simultane Messung von vier verschiedenen Fluoreszenzen erlaubt. Messbare Parameter sind hierbei die relative Größe sowie die relative Granularität/Komplexität der Zellen, ebenso wie deren spezifische und relative Fluoreszenz. Hierfür verwendete Antikörper sind mit einem Fluorochrom konjugiert. Die Menge des emittierten Fluoreszenzlichts ist dabei proportional zur Zahl der Fluorochrommoleküle. Um Proben für eine durchflusszytometrische Messung vorzubereiten, wurden die zu messenden Zellen zunächst gezählt und anschließend mit 500 µL Waschpuffer (5% (v/v) FBS in PBS) gewaschen (Zentrifugation für 5 Minuten bei 500 x g und 4 °C). Bis zu 10⁶ Zellen wurden in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß in 100 µL Waschpuffer aufgenommen und zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit 2,5 µL Hamsterserum und 2,5 µL Rattenserum versetzt. Die Zugabe der entsprechenden fluorochromkonjugierten Antikörper bzw. der Primärantikörper erfolgte in einer Konzentration von 0,2 µg/100 µL. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 4 °C wurden die Reaktionsgefäße mit Waschpuffer auf 500 µL aufgefüllt und für 5 Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Kam es zum Einsatz eines fluorochromkonjugierten Sekundärantikörpers bzw. Biotinkonjugates, wurde das Pellet erneut in 100 µL Waschpuffer aufgenommen und mit dem Sekundärantikörper bzw. Biotinkonjugat in einer Konzentration von 0,2 µg/100 µL versetzt. Es schlossen sich ein 15-minütiger Inkubationsschritt im Dunkeln bei 4 °C und zwei weitere Waschschriffe mit Waschpuffer an. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 100 µL Fixierungspuffer (3,7% (v/v) Formaldehydlösung in PBS) aufgenommen und für 10

Minuten im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Um die Zellen für bis zu drei Tage zu lagern, wurde die Fixierungslösung durch Zentrifugation (5 Minuten bei 500 x g und 4 °C) entfernt und das Zellpellet in 300 µL Aufbewahrungspuffer (2% (v/v) FBS, 0,1% (v/v) Natriumazid, 0,2 mM EDTA, in PBS) aufgenommen. Die Messung erfolgte dann innerhalb von 24 Stunden.

2.9 Intravenöse Injektion infizierter PBMC-Fraktionen

Murine PBMCs wurden mittels magnetischer Zellseparation in eine CD11b⁺- und eine CD11b⁻-Fraktion wie oben beschrieben aufgeteilt. Die Zellen wurden jeweils für 15 Stunden bei 37 °C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre mit GFP⁺ RH-Stamm-Tachyzoiten in einer Ratio von 1:1 inkubiert. Infektionsraten wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Jedem Tier (NMRI-Mäuse) wurden 10.000 infizierte Zellen in 0,2 mL PBS intravenös gespritzt. Nach einem, drei und sieben Tagen wurden die Gehirne entnommen, und mittels quantitativer LightCycler[®]-PCR wurde die Menge an vorhandener Toxoplasma-DNA untersucht.

2.10 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden statistische Unterschiede zwischen den Gruppen mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt, soweit eine Normalverteilung der Messwerte vorlag. Bei nicht normalverteilten Werten wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 bestätigte die Signifikanz der Unterschiede. Alle Experimente wurden mindestens drei Mal wiederholt.

Bei den von der Firma Miltenyi Biotec kommerziell durchgeführten und ausgewerteten Microarrays wurde ein 2-seitiger t-Test angewandt, um die Signifikanz eines Messwertes gegenüber der Kontrolle zu bestätigen.

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro-Untersuchungen zur Neuroinvasion durch *T. gondii*

3.1.1 Einfluss einer *T. gondii*-Infektion auf die Immunantwort von Hirnendothelzellen

3.1.1.1 Genexpressionsanalysen nach Infektion von Hirnendothelzellen mit *T. gondii*-Tachyzoiten

Spezialisierte Kapillarendothelzellen bilden die Grundlage der Blut-Hirn-Schranke. Diese muss der Parasit *T. gondii* überwinden, um bei einer akuten Infektion in das ZNS zu gelangen. Um den Einfluss einer *T. gondii*-Infektion auf die Genexpression von Hirnendothelzellen zu analysieren, wurden Microarray-Experimente mit Agilent Whole Genome Microarrays durchgeführt. Die Genregulation in der murinen Hirnendothelzelllinie bEnd.3 wurde 4 und 8 Stunden nach Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten des RH-Stammes untersucht (Infektionsratio 3:1). Durch den Vergleich zu einer nicht infizierten Kontrolle lässt sich die transkriptionelle Regulation von Wirts-Genen als Folge einer Infektion darstellen.

Aus den signifikant regulierten Wirtsgenen wurden solche ausgewählt, die für die direkte Neuroinvasion durch den Parasiten bzw. die transendotheliale Migration von (Toxoplasma-infizierten) Leukozyten von Bedeutung sein können [73, 143, 144, 145, 146, 147] (Abbildung 9). Die entsprechenden Genprodukte lassen sich 6 Gruppen zuordnen: Zytokine und Chemokine, Interleukine und deren Rezeptoren, Signaltransduktionsmoleküle, Zelloberflächenproteine (CDs, clusters of differentiation), Zelladhäsionsmoleküle und Junctional complex-Proteine. Daneben wurde auch die transkriptionelle Regulation weiterer Gene festgestellt, darunter Matrixmetalloproteinasen und der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4). Bei den Genen, die für neuroinvasive Vorgänge von potentiell Interesse sind, zeigte sich eine Hoch- bzw. Herunterregulation bis zum Faktor 14. Die überwiegende Mehrzahl der Gene wurde als Folge der Infektion aber hochreguliert. Bei einigen Genen konnte aufgrund signifikanter Messwerte bei 4 und 8 Stunden der Verlauf der Regulation dargestellt werden. Bei dem Chemokin CCL2 beispielsweise erhöhte sich die Expression zwischen den Zeitpunkten 4 und 8 Stunden vom 2,24-fachen auf den 2,95-fachen Wert der Kontrolle. Die Genexpression der Chemokine CCL7 und CX₃CL1 wurde nach 8 Stunden 8,84- bzw. 6,18-fach hochreguliert, während die Expression bei

JAM-4 oder Cdh20 nach 4 Stunden bereits bis zu 10,88-fach bzw. 14,23 hochreguliert war. Acht Stunden nach Infektion war die Expression des Signalmoleküls STAT4 um das 4,69-fache, die Expression der apoptose-relevanten Caspase 3 um das 1,13-fache reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Infektion mit *T. gondii* für entscheidende Veränderungen im Transkriptom der Wirtszellen verantwortlich ist, welche wiederum die extrazelluläre Neuroinvasion des Parasiten (z. B. durch Hochregulierung von ICAM-1) bzw. die Rekrutierung von Leukozyten als Transportzellen für Parasiten (z. B. durch Hochregulierung von Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen) vermitteln können.

3.1.1.2 Induktion der endothelialen ICAM-1-Expression durch Zugabe des Zytokins IFN γ und bei einer Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten

Von dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) ist bekannt, dass dessen Bindung an leukozytäre Liganden das Eindringen aktivierter Leukozyten in das ZNS unterstützt [148]. Da ICAM-1, wie bei Transkriptomanalysen zuvor gezeigt werden konnte, bei einer Infektion durch *T. gondii* hochreguliert wird, wurde im Folgenden auf Proteinebene der Einfluss einer parasitären Infektion auf die ICAM-1-Expression einer murinen Endothelzelllinie bzw. von primären Rattenhirnkapillarendothelzellen untersucht. Eine 48-stündige Inkubation von Endothelzellen mit 100 U/mL rekombinantem Ratten- bzw. Maus-IFN γ diente dabei als Positivkontrolle für die Hochregulierung von ICAM-1, da IFN γ eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegen *T. gondii* spielt und als potenter Aktivator für viele Zelltypen gilt [149, 150].

Als Infektionsdosis wurde eine Ratio von 1:1 gewählt. Im Durchflusszytometer konnte bei jedem Ansatz zwischen infizierten und nicht infizierten Endothelzellen einer Probe unterschieden werden, da die eingesetzten Tachyzoiten konstitutiv ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren (GFP⁺- bzw. GFP⁻-negative Zellen). Desweiteren ist die Menge der gebundenen anti-ICAM-1-Antikörper direkt proportional zur Menge an exprimiertem ICAM-1. Die Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des entsprechenden Antikörpers erfolgt jeweils als Vielfaches der MFI einer Kontrollpopulation, die zu keinem der genannten Zeitpunkte Kontakt mit IFN γ oder *T. gondii*-Tachyzoiten hatte (Ausgangswert der Kontrollpopulation: 1; mindestens 80% der naiven bEnd.3- bzw. der naiven primären Zellen waren positiv für ICAM-1, Daten sind nicht gezeigt).

Die Infektion der murinen Hirnendothelzelllinie bEnd.3 mit *T. gondii* führte im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen bzw. nicht infizierten Zellen des gleichen Wells zu einer signifikanten Hochregulierung der ICAM-1-Expression nach 2 und 36 Stunden (Abbildung 10A). Zwei und 36 Stunden nach Vorinkubation nicht infizierter bEnd.3-Zellen mit IFN γ war deren ICAM-1-MFI im Vergleich zu Kontrollzellen (ohne Infektion, ohne IFN γ) signifikant erhöht (Daten sind nicht gezeigt). Dies galt im gleichen Maße sowohl für die nicht infizierten bzw. die infizierten Zellen eines Wells, welches nicht mit IFN γ vorbehandelt worden war. Nach IFN γ -Vorinkubation und gleichzeitiger Infektion von Zellen konnten jedoch keine additiven oder synergistischen Effekte auf die ICAM-1-Expression festgestellt werden.

In Anlehnung an die Versuche mit bEnd.3-Zellen wurde bei infizierten primären Rattenhirnkapillarendothelzellen ebenfalls eine Hochregulierung der ICAM-1-Expression festgestellt. Zwei Stunden nach Infektion war die ICAM-1-MFI bei infizierten, unbehandelten Zellen größer als bei nicht infizierten, unbehandelten Zellen des gleichen Wells. Dasselbe galt nach 36 Stunden für infizierte, IFN γ -behandelte Zellen sowie nicht infizierte, IFN γ -behandelte Zellen des gleichen Wells (Abbildung 10B). Eine Vorinkubation von Rattenhirnkapillarendothelzellen mit IFN γ erhöhte die MFI der ICAM-1-Expression verglichen mit nicht infizierten, unbehandelten Zellen, während nach 36 Stunden synergistische Effekte einer gleichzeitigen IFN γ -Inkubation und Infektion im Vergleich zu einer IFN γ -Inkubation oder einer Infektion allein deutlich wurden.

Die vorliegenden Ergebnisse sind unabhängig von der verwendeten Infektionsratio, da mit einer Parasiten:Zell-Ratio von 5:1 vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden (Daten sind nicht gezeigt). Durch den Einsatz einer murinen Hirnendothelzelllinie und primären Rattenhirnendothelzellen konnte festgestellt werden, dass die erhaltenen Ergebnisse zur ICAM-1-Induktion speziesunabhängig sind. Die Verwendung der Zelllinie bEnd.3 bestätigte die aus den Microarrays gewonnenen Ergebnisse zu ICAM-1 zusätzlich auf Proteinebene. Die Miteinbeziehung primärer Rattenendothelzellen lieferte für die nachfolgenden Experimente am Bluthirnschrankmodell wichtige Erkenntnisse zur infektionsbedingten Expression von ICAM-1, welches die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel vermittelt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse aus in-vitro-Modellen, dass *T. gondii* die Hochregulierung der ICAM-1-Expression induziert und damit möglicherweise die Leukozytenmigration über das Endothel unterstützt.

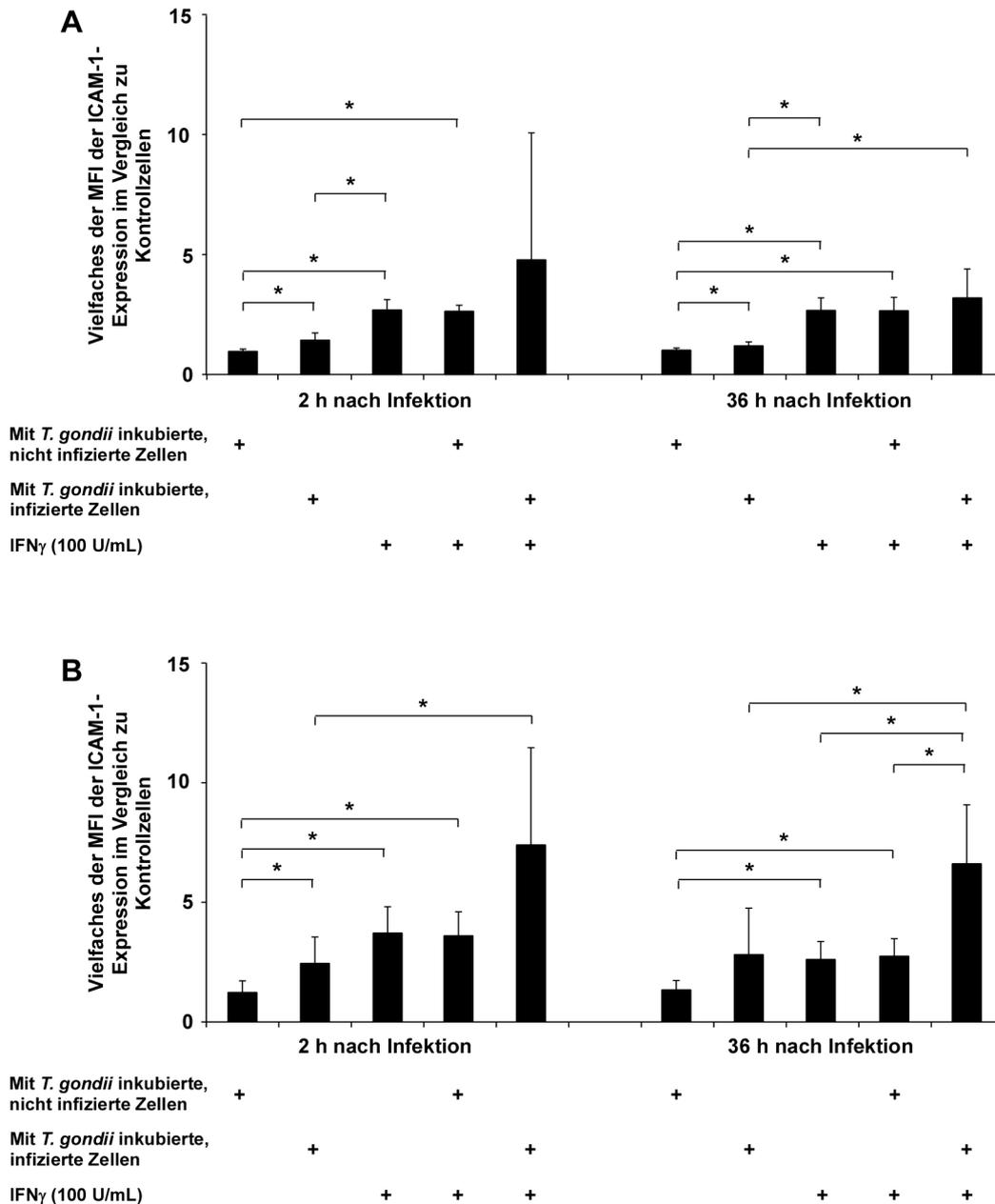


Abbildung 10: ICAM-1-Expression von (A) murinen Endothelzellen (bEnd.3) und (B) primären Rattenendothelzellen (pRBECs). Endothelzellen wurden mit 100 U/mL rekombinantem IFN γ für 48 Stunden vorbehandelt oder verblieben unbehandelt und wurden daraufhin mit GFP $^{+}$ -Tachyzoiten des RH-Stammes (Ratio 1:1) inkubiert. Die MFI der ICAM-1-Expression wurde 2 und 36 Stunden nach Infektion mittels Durchflusszytometrie untersucht und ist als Vielfaches von nicht IFN γ -behandelten und nicht infizierten Kontrollzellen dargestellt. Dabei wurde auch zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen des gleichen Wells unterschieden. Die abgebildeten Ergebnisse fassen jeweils drei unabhängige Experimente zusammen. * $p < 0,05$

3.1.1.3 Hochregulierung der endothelialen ICAM-1-Expression und Sekretion proinflammatorischer Moleküle nach Infektion mit Typ I-Stamm- (RH) und Typ II-Stamm- (ME49) Tachyzoiten

Eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die vermehrte Sekretion von proinflammatorischen Molekülen und Zytokinen leisten einen wichtigen Beitrag zur transendothelialen Migration. Im Rahmen der Extravasation fungiert beispielsweise MCP-1 als chemotaktisches Signal für Leukozyten, während dem proinflammatorischen Zytokin IL-6 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Leukozyten zukommt. ICAM-1 vermittelt wiederum die Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten. Barragan et al. konnten zeigen, dass das Migrationsverhalten von *T. gondii* im Zusammenhang mit der jeweiligen Virulenz eines Stammes steht und die Typ I- und Typ II-Stämme von *T. gondii* unterschiedliche migratorische Eigenschaften aufweisen [133]. Diese beiden Stämme wurden nun auch in Bezug auf die Induktion der ICAM-1-Expression und der IL-6- bzw. MCP-1-Sekretion untersucht. Hierfür wurden bEnd.3-Zellen für 2 Stunden in einer Ratio von 1:1 mit GFP⁺-Tachyzoiten des Typ I-Stammes RH bzw. des Typ II-Stammes ME49 Stammes von *T. gondii* inkubiert. Nicht invadierte extrazelluläre Tachyzoiten wurden anschließend durch Waschschriffe entfernt und die Endothelzellen zu verschiedenen Zeitpunkten (2, 12, 24, 36 und 48 Stunden) nach der Infektion durchflusszytometrisch untersucht.

Obwohl die Infektion der murinen bEnd.3-Zellen mit derselben Ratio an RH-Stamm- bzw. ME49-Stamm-Tachyzoiten erfolgte, erreichten Typ II-ME49-Tachyzoiten im Zeitraum von 2 bis 24 Stunden (tendenziell) signifikant höhere Infektionsraten (Abbildung 11A). Zum Zeitpunkt 36 Stunden nach Infektion hatte die Anzahl infizierter Endothelzellen bei beiden Gruppen weiter zugenommen, und es war kein signifikanter Unterschied mehr im Infektionsverhalten der beiden Stämme zu erkennen. Die Erhöhung der Infektionsraten im Verlauf des Experimentes lässt sich auf eine schnelle Lyse bereits infizierter Zellen und eine Neuinfektion benachbarter Zellen zurückführen. Die höchste prozentuale Infektionsrate beider Stämme war nach 48 Stunden erreicht und lag bei circa 11% infizierten Endothelzellen. Die Inkubation mit einer Ratio von 5:1 führte zu ähnlichen Infektionsraten (Daten sind nicht gezeigt). Im Zeitraum von 2 bis 48 Stunden nach Infektion mit dem Typ I-Stamm RH bzw. dem Typ II-Stamm ME49 von *T. gondii* zeigten die bEnd.3-Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen einer separaten Kontrollpopulation eine verstärkte MFI der ICAM-1-Expression (Abbildung 11B); die ICAM-1-Expression war nach Infektion mit Typ I-

Stamm RH- (2, 12, 24 Std.) und Typ II-Stamm ME49-Tachyzoiten (2 - 48 Std.) signifikant gegenüber nicht infizierten Zellen des gleichen Wells erhöht. Die ICAM-1-Expression unterschied sich zwischen 12 und 48 Std. signifikant bei Zellen, die mit Typ I- oder Typ II-Tachyzoiten infiziert worden waren. Die Inkubation in einer Ratio von 5:1 führte zu ähnlichen ICAM-1-Expressionsraten (Daten sind nicht gezeigt).

Zusätzlich zur ICAM-1-Expression wurde die endotheliale Sekretion des Zytokins IL-6 nach Infektion mit Typ I-Stamm RH- oder Typ II-Stamm ME49-Tachyzoiten untersucht. Bei nicht infizierten Kontrollzellen wurde ab 12 Stunden nach Infektion eine geringe IL-6-Produktion nachgewiesen (Daten sind nicht gezeigt). Tachyzoiten des Typ II-Stammes ME49 induzierten eine messbare IL-6-Produktion 12 Stunden nach Infektion, während die IL-6-Sekretion der durch den Typ I-Stamm RH infizierten Endothelzellen erstmalig 24 Stunden nach Infektion nachweisbar war (Abbildung 11C). Die IL-6-Sekretion nach ME49-Infektion blieb im Vergleich zu einer RH-Infektion über den Zeitraum von 24 bis 48 Stunden signifikant erhöht. Um auszuschließen, dass eine erhöhte Zytokinsekretion mit einer prozentual höheren Infektionsrate der einzelnen Zellpopulationen einhergeht, wurde die Zytokinproduktion relativ zur prozentualen Infektionsrate der Zellen betrachtet. Auch hier war der ME49-Stamm dem RH-Stamm bei der Induktion der IL-6-Sekretion signifikant überlegen (Abbildung 11D). Die Inkubation in einer Ratio von 5:1 führte zu ähnlichen Zytokinspiegeln (Daten sind nicht gezeigt).

Das Chemokin MCP-1 konnte in sehr geringen Mengen bereits 2 Stunden nach Infektion der Endothelzellen mit Tachyzoiten des Typ I-Stammes RH nachgewiesen werden, während nach Infektion mit Tachyzoiten des Typ II-Stammes ME49 MCP-1 erstmals nach 12 Stunden im Überstand festgestellt wurde (Abbildung 11E). 24 Stunden nach Infektion übertraf die MCP-1-Sekretion der mit dem Typ II-Stamm ME49 infizierten Zellen die Sekretion der Kontrollzellen signifikant, bei den mit dem Typ I-Stamm RH infizierten Zellen war dies erst nach 48 Stunden der Fall. Die MCP-1-Sekretion nach ME49-Infektion blieb im Vergleich zu einer RH-Infektion im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nach Infektion signifikant erhöht. Für die Sekretion von MCP-1 wurde ebenfalls die Ratio aus Zytokinproduktion und prozentualer Infektionsrate der Zellen erstellt (Abbildung 11F); die Infektion mit Typ II-Stamm ME49-Tachyzoiten resultierte im Vergleich zur Infektion mit Typ I-Stamm RH-Tachyzoiten unabhängig von der Infektionsrate in einer signifikant gesteigerten

MCP-1-Sekretion. Die Inkubation in einer Ratio von 5:1 führte zu vergleichbaren MCP-1-Spiegeln (Daten sind nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Tachyzoiten des Typ II-Stammes ME49 unabhängig von der Infektionsrate eine stärkere Immunantwort bei Endothelzellen auslösen als Tachyzoiten des Typ I-Stammes RH. Die Infektion mit Tachyzoiten des Typ II-Stammes ME49 resultierte in einer stärkeren Hochregulierung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 sowie einer stärkeren Sekretion der Zytokine IL-6 und MCP-1. Auf den ersten Blick widersprechen diese Ergebnisse der Erwartung, dass der mausvirulente Stamm RH höhere Dosen der genannten Zytokine bzw. des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 induzieren müsste als der avirulente Stamm ME49. Es wird jedoch vermutet, dass bei dem mausvirulenten Typ II-Stamm ME49 die stärkere inflammatorische Antwort in der Frühphase der Infektion dafür sorgt, dass die Letalität der Infektion (welche beispielsweise durch hohe Parasitenzahlen gekennzeichnet ist) vermindert wird und das Überleben des Wirtes sichert.

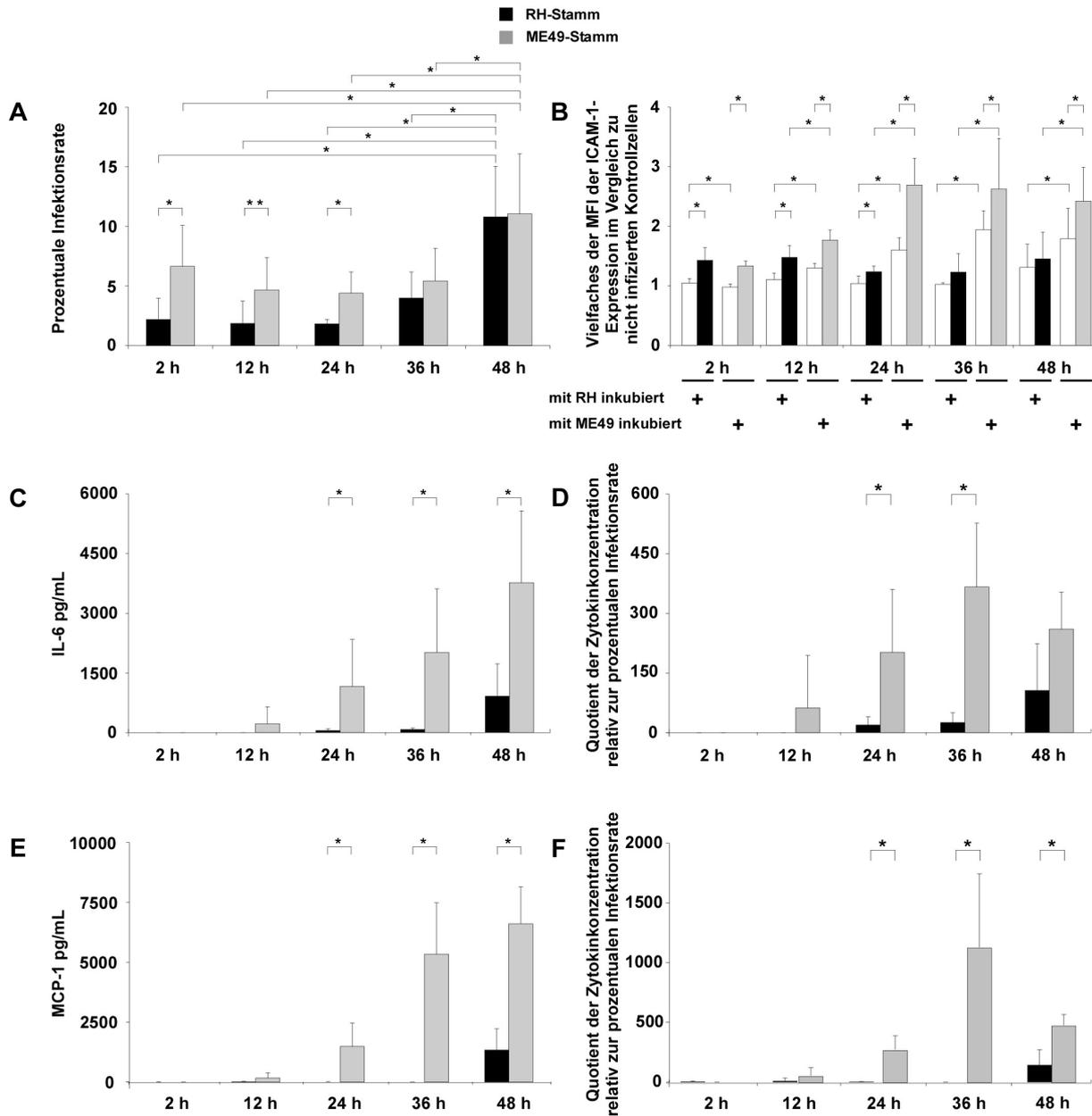


Abbildung 11: Kinetik der *T. gondii*-Infektion einer murinen Hirndendothelzelllinie. bEnd.3-Zellen wurden für 2 Stunden entweder mit dem Typ I-Stamm RH oder Typ II-Stamm ME49 von *T. gondii* (Ratio 1:1) inkubiert. (A) Prozentuale Infektionsrate von bEnd.3-Zellen nach Inkubation mit RH-Stamm- oder ME49-Stamm-Tachyzoiten (Ratio 1:1). (B) Mittlere Fluoreszenzintensität der ICAM-1-Expression von bEnd.3-Zellen. Die MFI wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ist als Vielfaches der MFI von nicht infizierten Kontrollzellen zu den gleichen Entnahmezeitpunkten angegeben. Es wurde dabei unterschieden zwischen nicht infizierten (weiße Balken) und RH-Stamm- (schwarze Balken) bzw. ME49-Stamm- (graue Balken) infizierten Endothelzellen eines Wells. (C) IL-6-Sekretion von bEnd.3-Zellen nach Infektion mit RH- und ME49-Tachyzoiten (ELISA). (D) Quotient endothelialer IL-6-Sekretion (aus C) und prozentualer Infektionsrate der Zellen. (E) MCP-1-Produktion von bEnd.3-Zellen nach Infektion mit RH- und ME49-Tachyzoiten (ELISA). (F) Die endotheliale MCP-1-Sekretion (aus E) wurde mit der prozentualen Infektionsrate der Zellen in Korrelation gesetzt. Die abgebildeten Ergebnisse fassen jeweils drei unabhängige Experimente zusammen. * $p < 0,05$, ** $p = 0,0503$ (tendenziell signifikant)

3.1.2 Validierung eines in-vitro-Modells der Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Bevor das in-vitro-Modell der BHS für Migrationsexperimente eingesetzt werden konnte, erfolgte eine grundlegende Validierung des Systems. Durch den Nachweis BHS-spezifischer physikalischer und funktioneller Charakteristika wurde die Verlässlichkeit des Modells demonstriert.

3.1.2.1 Charakterisierung der primären Zellen durch Immunfluoreszenz

Die Reinheit einer primären Endothelzellkultur ist entscheidend für die Ausbildung von charakteristischen Eigenschaften der BHS im in-vitro-Modell [151]. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen primäre Rattenhirnkapillarendothelzellen (pRBECs) langgestreckt und spindelförmig. Ein weiteres charakteristisches Merkmal eines konfluenten Monolayers ist die wirbelförmige Anordnung der Zellen (Abbildung 12A). Kapillarendothelzellen des Gehirns exprimieren zudem Tight junction-Proteine wie ZO-1 und Occludin, die die Permeabilität der BHS regulieren. Die Abbildungen 12C und 12D zeigen die hauptsächliche Lokalisierung dieser Proteine in den Bereichen zwischen aneinandergrenzenden Endothelzellen. Weibel-Palade-Körperchen sind endothelspezifische Zellkompartimente, in denen neben dem Adhäsionsmolekül P-Selektin auch der sogenannte von-Willebrand-Faktor (vWF) vorliegt [78]. Der Einsatz fluoreszierender Antikörper gegen den Endothelzellmarker vWF resultierte in einer granulierten Färbung, die über die ganze Zelle verteilt war (Abbildung 12E). Auch bei durchflusszytometrischer Messung exprimierten über 98% der isolierten Zellen vWF (Daten sind nicht gezeigt). Für das Kokulturmodell der BHS wurden neben primären Rattenhirnkapillarendothelzellen auch primäre Gliazellen aus dem Rattenhirn eingesetzt. Abbildung 12B zeigt die lichtmikroskopische Darstellung einer konfluenten Gliazellkultur. Astrozyten besitzen einen flachen Zellkörper und werden von Oligodendrozyten teilweise überwachsen. GFAP kommt im Zytoplasma von Gliazellen und hierbei überwiegend in Astrozyten vor [152]. In Abbildung 12F erkennt man deutlich die Struktur der grün gefärbten Intermediärfilamente in Astrozyten. GFAP dient vermutlich der Zellstabilität sowie der Beweglichkeit von Astrozyten und ist ein häufig verwendeter Astrozytenmarker [153].

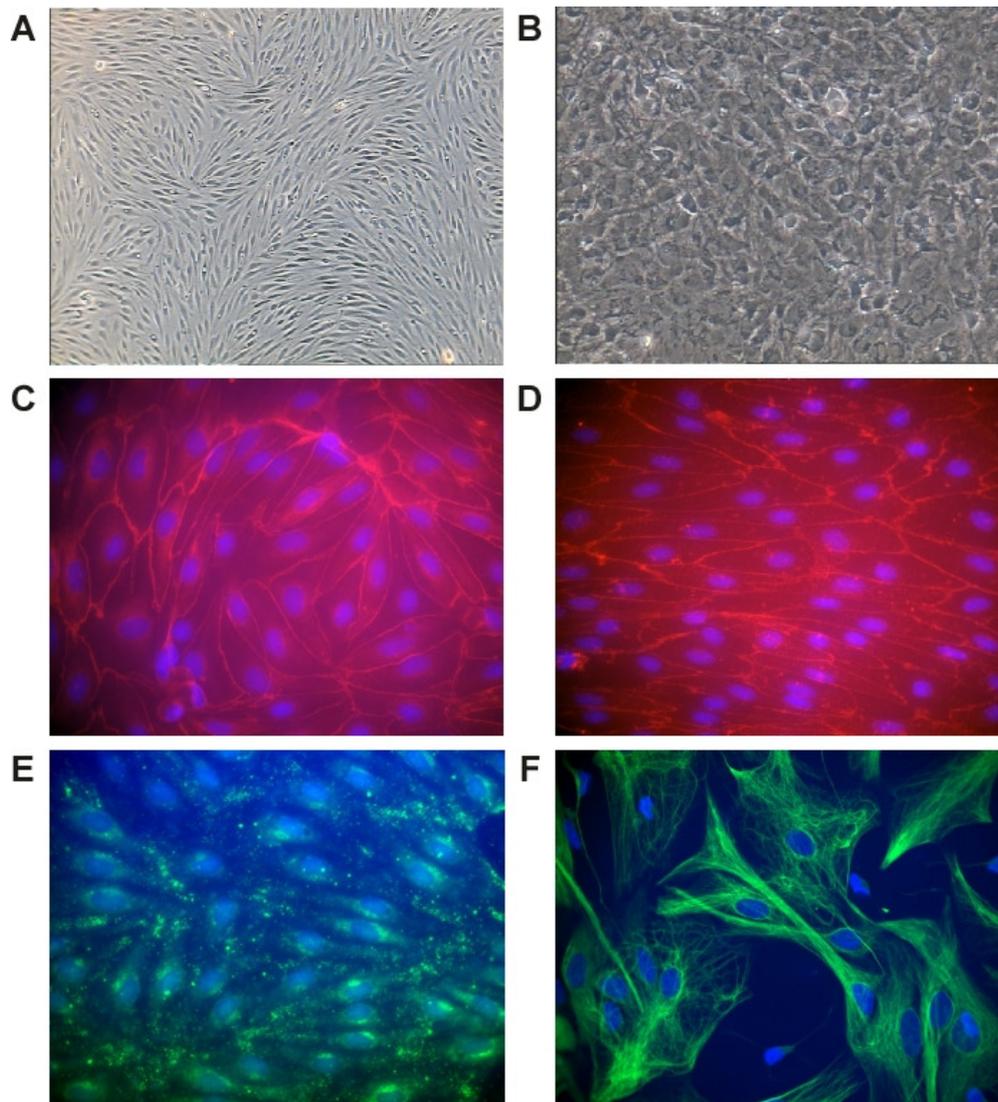


Abbildung 12: Mikroskopischer Nachweis zellspezifischer Charakteristika und Marker bei primären Zellen. Lichtmikroskopische Darstellung von pRBECs (A) bzw. Gliazellen (B). Durch den Einsatz von Immunfluoreszenzantikörpern werden die endothelialen Tight junction-Proteine ZO-1 (rot) (C) und Occludin (rot) (D) erkennbar, ebenso der in Weibel-Palade-Körperchen gespeicherte von-Willebrand-Faktor (grün) (E). Primäre Gliazellen sind positiv für das astrozytenspezifische Protein GFAP (rot) (F). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

3.1.2.2 Physikalische Validierung: TEER-Messung

Bei den TEER-Messungen an der endothelialen Barriere wurden Werte von bis zu $350 \Omega \times \text{cm}^2$ erreicht, sodass sich nach Abzug des Leerfilterwertes ($90 - 100 \Omega \times \text{cm}^2$) ein Nettowert von circa $250 \Omega \times \text{cm}^2$ ergibt. Endothelpräparate, die nach Abzug des Leerfilterwertes einen TEER-Wert von unter $200 \Omega \times \text{cm}^2$ aufwiesen, wurden nicht für Experimente eingesetzt.

3.1.2.3 Funktionelle Validierung: Permeabilitätsmessung

Eine intakte BHS zeichnet sich u. a. durch eine geringe Permeabilität für wasserlösliche Substanzen aus. Dies beruht auf der geringen pinozytotischen Aktivität der Kapillarendothelzellen sowie den Tight junctions zwischen den Zellen. Zur Standardisierung der Permeabilitätsdaten wird der Permeabilitätskoeffizient P_e berechnet. Bei Permeabilitätsmessungen ist darauf zu achten, dass die zur Messung eingesetzten Tracersubstanzen keine Liganden für Effluxtransporter, endotheliale Rezeptoren oder endotheliale Enzyme sind. Für die Permeabilität von Evans Blue-Albumin wurde ein Wert von 2×10^{-6} cm/s ermittelt (transzelluläre Permeabilität), für Natriumfluoreszein ein Wert von 5×10^{-6} cm/s (parazelluläre Permeabilität). Aufgrund dieser Werte kann davon ausgegangen werden, dass die endotheliale Barriere neben einer geringen transzellulären Permeabilität auch eine geringe parazelluläre Permeabilität aufwies.

3.1.2.4 Funktionelle Validierung: Migration von Ratten-PBMCs in Richtung eines MCP-1-Gradienten

MCP-1 stellt ein starkes chemotaktisches Signal für Monozyten und dendritische Zellen dar. Durch die Zugabe von rekombinantem Ratten-MCP-1 (100 ng/mL) in das untere Kompartiment des Kokulturmodells wurde ein Chemokingradient hergestellt, der der Anlockung von definierten Zellpopulationen dienen sollte. Nach dreistündiger Koinkubation von Ratten-PBMCs im luminalen (oberen) Kompartiment und Medium mit bzw. ohne MCP-1 im unteren (abluminalen) Kompartiment wurden die migrierten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 13). Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Antikörpern zur Charakterisierung von Rattenleukozyten wurden die zu untersuchenden Zellen lediglich in $CD45^+/CD11bc^-$ -Zellen (B- und T-Lymphozyten) sowie $CD45^+/CD11bc^+$ -Zellen (antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten und dendritische Zellen) unterschieden. Das Oberflächenmolekül CD45 gilt dabei als Pan-Leukozytenmarker, der kombinierte Antikörper anti-CD11bc identifiziert zusätzlich die antigenpräsentierenden Zellen einer Population. Die meisten anderen Antikörper für entsprechende Rattenzellen stellten sich als wenig spezifisch heraus (Daten sind nicht gezeigt).

Die Ausgangspopulation des peripheren Bluts enthielt mit 79,84% $CD45^+/CD11bc^-$ -Zellen und 20,16% $CD45^+/CD11bc^+$ -Zellen signifikant mehr lymphozytäre Zellen als

antigenpräsentierende Zellen. Nach der Migration von nicht stimulierten und nicht infizierten Zellen setzte sich die Population im unteren Kompartiment aus 65,74% lymphozytären Zellen und 34,26% antigenpräsentierenden Zellen zusammen, sodass der Anteil lymphozytärer Zellen noch immer signifikant höher lag. Die Zugabe des monozytenspezifischen Signalmoleküls MCP-1 in das untere Kompartiment führte zu einer hohen Migrationsrate der antigenpräsentierenden $CD45^+/CD11bc^+$ -Zellen und erhöhte den Anteil dieser Zellen signifikant gegenüber den $CD45^+/CD11bc^-$ -Lymphozyten (69,11% $CD45^+/CD11bc^+$ -Zellen und 30,89% $CD45^+/CD11bc^-$ -Zellen).

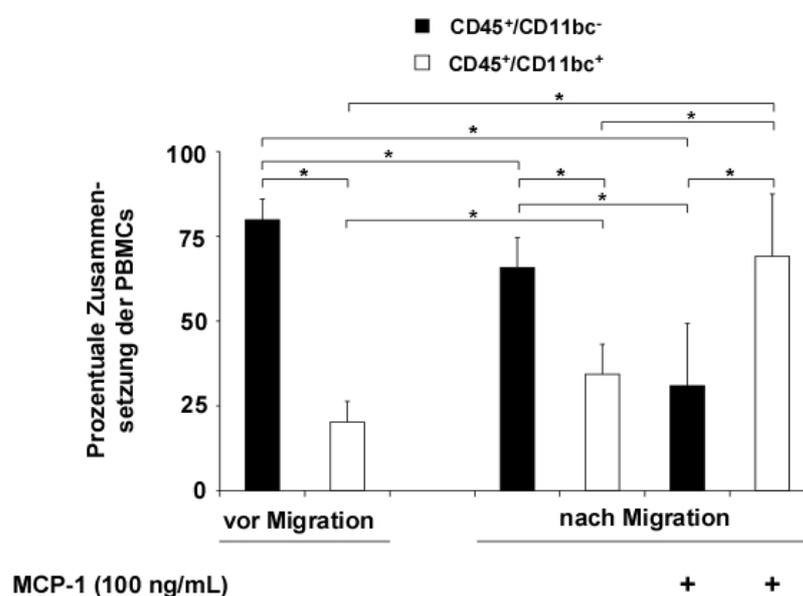


Abbildung 13: Funktionelle Validierung des in-vitro-Modells der Blut-Hirn-Schranke. Durch Zugabe von 100 ng/mL rekombinatem Ratten-MCP-1 in das untere Kompartiment wurde für Ratten-PBMCs im oberen Kompartiment ein chemotaktischer Gradient erstellt. Nach drei Stunden wurde der prozentuale Anteil an lymphozytären $CD45^+/CD11bc^-$ -Zellen und antigenpräsentierenden $CD45^+/CD11bc^+$ -Zellen im unteren Kompartiment durchflusszytometrisch bestimmt. Für jede Versuchsbedingung wurden die Zellen von 10 - 12 Filtern verwendet. Die abgebildeten Ergebnisse fassen sieben unabhängige Experimente zusammen. * $p < 0,05$

3.1.2.5 Blockierung der PBMC-Migration durch Zugabe von anti-Ratten-ICAM-Antikörpern

Ein weiterer Schritt bei der Validierung des in-vitro-Modells der BHS bestand darin, den Einfluss von anti-Ratten-ICAM-1-Antikörpern auf die Migration von murinen PBMCs über das in-vitro-Modell der BHS zu untersuchen. ICAM-1 stellt dabei ein wichtiges Adhäsionsmolekül für die transendotheliale Migration von Leukozyten dar. Die gleichzeitige Zugabe von 0,5 $\mu\text{g/mL}$ eines anti-Ratten-ICAM-1-Antikörpers und 3×10^5 murinen PBMCs zum oberen Kompartiment eines Kokulturfilters führte nach

dreistündiger Inkubationsdauer zu einer deutlichen Inhibierung der Migrationskapazität. Im Vergleich zu einer nicht mit Antikörpern behandelten Kontrolle wurde die Zellmigration zu über 85% gehemmt (Daten sind nicht gezeigt).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass das verwendete in-vitro-Modell der BHS eine selektive Leukozytenbarriere darstellt und durch exogene Faktoren manipuliert werden kann. Das Modell eignet sich somit für die Untersuchung der transendothelialen Migration von naiven und *T. gondii*-infizierten Leukozyten.

3.1.3 Migration von Ratten-PBMCs durch ein in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke (BHS)

3.1.3.1 Migration von Ratten-PBMCs nach Inkubation der Endothelzellen mit TNF α

TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von Gliazellen des Gehirns nach Infektion mit *T. gondii* sezerniert wird [49] und die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen induziert [154]. Diese Aussage konnte auch im Rahmen der vorliegenden Dissertation verifiziert werden, da primäre Rattenhirnendothelzellen (pRBECs) nach dreistündiger Inkubation mit rekombinantem Ratten-TNF α eine verstärkte ICAM-1-Expression aufwiesen (Western Blot, Daten sind nicht gezeigt). TNF α wurde in einer Konzentration von 100 ng/mL im Rahmen einer dreistündigen Vorinkubation und während der Migration in das untere Transwell-Kompartiment zugegeben (abluminales Kompartiment entspricht theoretisch der Seite des Gehirnparenchyms). Die Analyse der migrierten Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied in der Migrationsrate von Leukozyten der TNF α -behandelten Endothelzellfilter oder den entsprechenden nicht behandelten Kontrollfiltern. Dennoch war bei beiden Ansätzen der prozentuale Anteil an antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen signifikant höher als in der Ausgangspopulation (Abbildung 14).

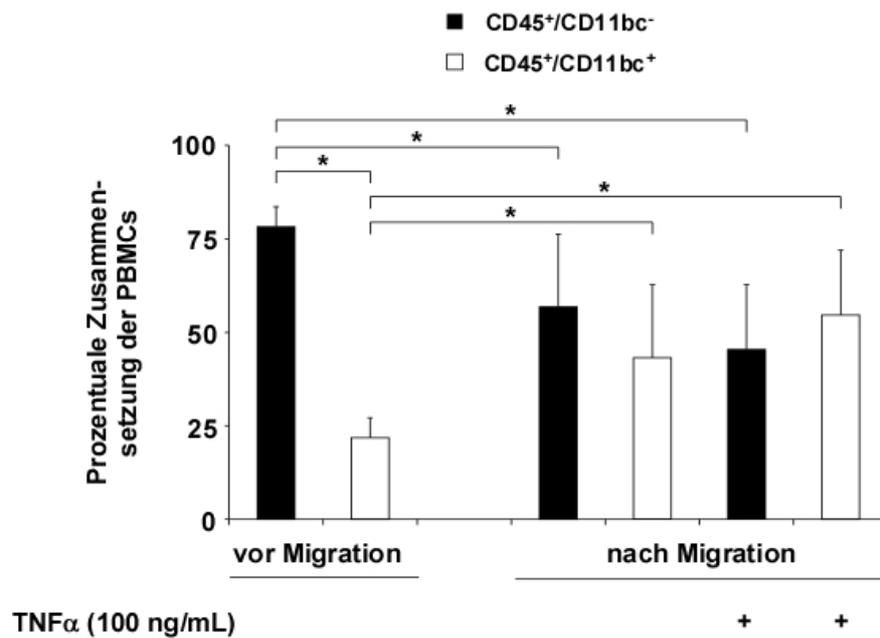


Abbildung 14: Migration naiver Ratten-PBMCs über das Kokulturmodell der Blut-Hirn-Schranke nach TNF α -Stimulation. Während das untere Kompartiment des Transwellsystems 100 ng/mL rekombinantes Ratten-TNF α enthielt wurden zum oberen Kompartiment 3×10^5 Ratten-PBMCs zugegeben. Nach 3 Stunden wurde der prozentuale Anteil an lymphozytären CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen und antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen in der Kontrollgruppe bzw. der mit TNF α -behandelten Gruppe durchflusszytometrisch bestimmt. Für jede Versuchsbedingung wurden die Zellen von 10 - 12 Filtern verwendet. Die abgebildeten Ergebnisse fassen drei unabhängige Experimente zusammen. * $p < 0,05$

3.1.3.2 Migration infizierter Ratten-PBMCs

Barragan et al. konnten zeigen, dass eine Subpopulation von Typ I-Stamm-Tachyzoiten einem sogenannten „long distance migration (LDM) phenotype“ zugeordnet werden kann. Extrazelluläre Tachyzoiten ausschließlich dieses Typs sind in der Lage, besonders weite Strecken auf einem Wirtszellmonolayer zurückzulegen [19]. Bei Lambert et al. wurden dendritische Zellen nach Infektion mit Typ I-Stamm Tachyzoiten in einen Zustand der Hypermotilität versetzt, der es ihnen erlaubte, auch in Abwesenheit eines Chemokingradienten zu wandern [155]. Um einen möglichen Effekt im in-vitro-Modell der BHS möglichst sicher kenntlich zu machen, wählte ich für die Versuche den Typ I-Stamm RH.

Um die Migration von *T. gondii*-infizierten Leukozyten des peripheren Bluts über die BHS zu untersuchen, wurden zuerst Ratten-PBMCs für 2 Stunden mit Tachyzoiten in einer Ratio von 1:1 inkubiert. Nachdem durch Waschschrte noch vorhandene extrazelluläre Tachyzoiten entfernt worden waren, erfolgte die Zugabe der PBMCs in das luminale Kompartiment des Transwellsystems. Nach dreistündiger Inkubation wurden die migrierten Zellen aus dem abluminalen Kompartiment geerntet und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Ausgangs-PBMC-Population konnte in

86,82% \pm 4,45% nicht infizierte und 0,75% \pm 1,14% infizierte lymphozytäre CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen sowie 12,07% \pm 4,52% nicht infizierte und 0,36% \pm 0,17% infizierte antigenpräsentierende CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen unterteilt werden (Abbildung 15A). Der Unterschied zwischen den infizierten Fraktionen war nicht signifikant. Die migrierten Zellen setzten sich aus 69,12% \pm 9% nicht infizierten und 0,6% \pm 0,63% infizierten lymphozytären CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen sowie 25,42% \pm 6,68% nicht infizierten und 4,86% \pm 2,63% infizierten antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen zusammen. Der prozentuale Anteil infizierter lymphozytärer CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen nach der Migration unterschied sich damit nicht signifikant von dem Anteil vor der Migration. Im Gegensatz dazu war bei den antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen (13,57-fach). Der Anteil infizierter antigenpräsentierender CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen vs. infizierter lymphozytärer CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen in der Gesamtpopulation war nach der Migration um das 8-fache größer.

Während die Absolutzahlen der infizierten lymphozytären CD45⁺/CD11bc⁻- und antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen vor der Migration 2.228,93 (\pm 3.404,36) und 1.067,59 (\pm 519,67) betragen, war die Zahl infizierter antigenpräsentierender CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen nach der Migration dominierend (18,5 Zellen (\pm 20,91) vs. 2,38 Zellen (\pm 2,83)).

Eine weitere Untersuchung der Infektionsraten bei den einzelnen Subpopulationen vor und nach Migration bestätigte ein verstärktes Wanderungsverhalten der Zellen als Folge einer *T. gondii*-Infektion. Vor der Migration waren 0,85% aller lymphozytären CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen infiziert, während die Infektionsrate der antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen bei 2,88% lag (Abbildung 15B). Nach der Migration stieg die Infektionsrate der antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen auf 16,05% (5,5-facher Anstieg) und war damit 18-fach größer als die Infektionsrate der lymphozytären CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen. Deren Infektionsrate blieb vor und nach Migration jeweils unter 1%. Interessanterweise waren in Folge des Kontaktes mit *T. gondii* nicht nur die infizierten sondern ebenso nicht infizierte antigenpräsentierende CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen des gleichen Ansatzes vermehrt durch die BHS gewandert. Der Anteil nicht infizierter antigenpräsentierender CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen stieg von 12,07% \pm 4,52% vor Migration auf 25,42% \pm 6,68% nach Migration an (Abbildung 15A). In Migrationsexperimenten mit PBMCs, die nie in

Kontakt mit *T. gondii* gekommen waren, wanderten ebenfalls präferentiell antigenpräsentierende CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen (Daten sind nicht gezeigt).

Anschließend wurde die Gesamtheit aller infizierten Zellen definiert. Wie aus Abbildung 15C ersichtlich wird, ergab sich vor der Migration kein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung infizierter lymphozytärer CD45⁺/CD11bc⁻- und antigenpräsentierender CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen. In der migrierten, infizierten Zellpopulation dominierten jedoch die antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen. Die Tatsache, dass die infizierten lymphozytären CD45⁺/CD11bc⁻- und antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen nicht 100% aller als GFP⁺ definierten Zellen ausmachen ist auf autofluoreszente Eigenschaften andere Zellen zurückzuführen. In Vorversuchen wurde geklärt, dass diese „falsch-positiven“ Ereignisse in der Durchflusszytometrie keine extrazellulären, migrierenden GFP⁺-Tachyzoiten sind.

Diese Ergebnisse bedeuten, dass infizierte antigenpräsentierende CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen eine stärkere migratorische Kapazität als infizierte lymphozytäre CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen besitzen und für den Transport von *T. gondii* über die Blut-Hirn-Schranke prädestiniert scheinen. Im Rahmen der Infektion mit *T. gondii* sezernieren die erwähnten Zellen möglicherweise Zytokine, die zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen führen und nachfolgend zur verstärkten Migration nicht infizierter Zellen durch die endotheliale Barriere beitragen.

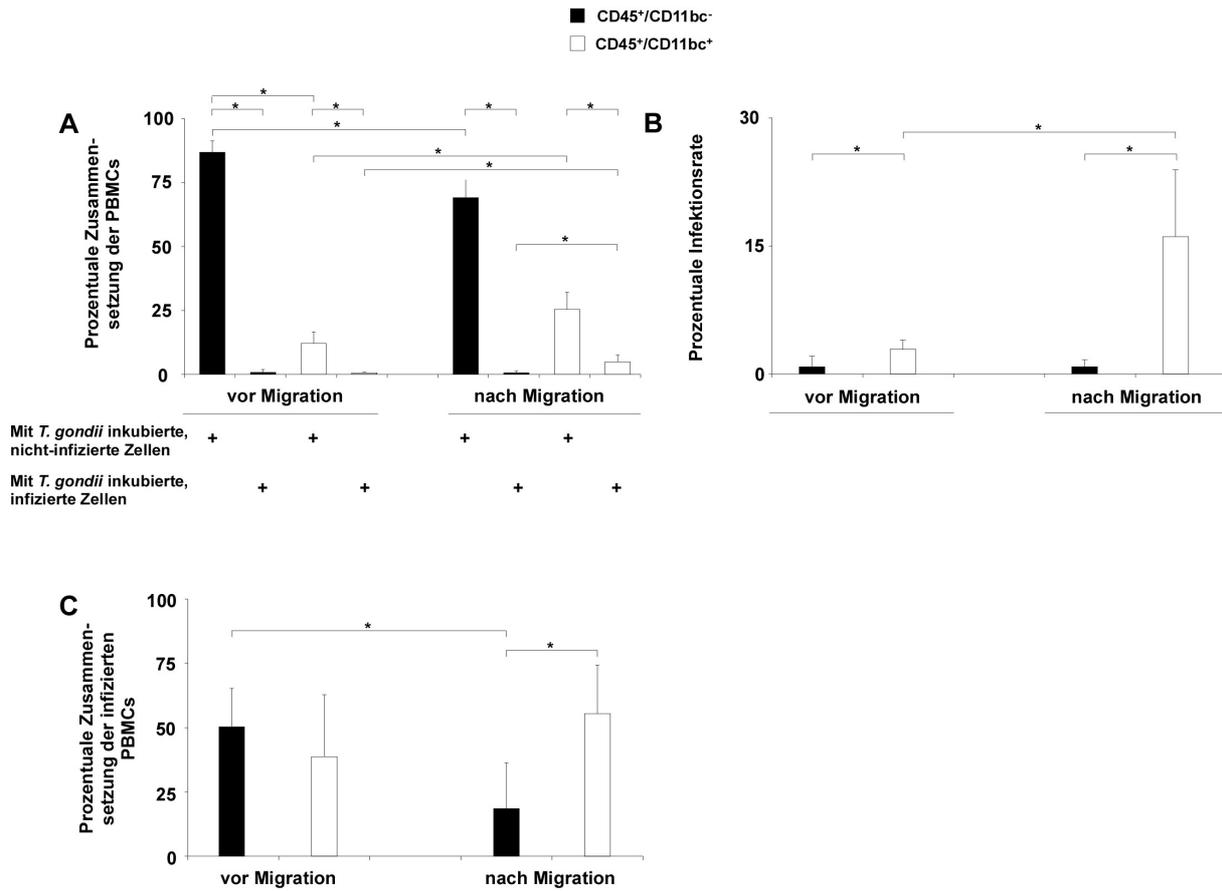


Abbildung 15: Migration infizierter Ratten-PBMCs durch die BHS. Ratten-PBMCs wurden für 2 Stunden mit GFP⁺ Typ I-Stamm-Tachyzoiten (RH) (Ratio 1:1) inkubiert und zum oberen Kompartiment des Transwellsystems zugegeben. Nach 3 Stunden wurde der prozentuale Anteil an lymphozytären CD45⁺/CD11bc⁻ und antigenpräsentierenden CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Infizierte (GFP⁺) und nicht infizierte Zellen desselben Ansatzes wurden untersucht. (A) Zusammensetzung aller CD45⁺/CD11bc⁻ bzw. CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen vor und nach Migration. (B) Infektionsraten der CD45⁺/CD11bc⁻ bzw. CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen vor und nach Migration. (C) Zusammensetzung der infizierten CD45⁺/CD11bc⁻ bzw. CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen vor und nach Migration. Für jede Versuchsbedingung wurden die Zellen von 10 - 12 Filtern verwendet. Die abgebildeten Ergebnisse fassen jeweils sieben unabhängige Experimente zusammen. * p < 0,05

3.1.4 Migration von Maus-PBMCs durch ein in-vitro-Modell der Blut-Hirnschranke (BHS)

3.1.4.1 Funktionelle Validierung: Migration von Maus-PBMCs in Richtung eines MCP-1-Gradienten

Da der Mangel an zellspezifischen Antikörpern es nicht erlaubte, einzelne Subpopulationen der Ratten-PBMCs zu charakterisieren, wurden in weiteren Experimenten Maus-PBMCs und Antikörper gegen die Marker CD11b und CD11c eingesetzt. Aus der Verwendung dieser zwei Marker ergeben sich drei Kombinationen. CD11b⁺/CD11c⁻-Zellen stellen eine monozytäre Subpopulation dar,

während CD11b⁻/CD11c⁻- bzw. CD11b⁺/CD11c⁺-Zellen Subpopulationen dendritischer Zellen (DCs) entsprechen.

In das untere Kompartiment des Kokultursystems wurde Medium ohne bzw. mit 100 ng/mL rekombinatem Maus-MCP-1 vorgelegt, während sich im oberen Kompartiment aus Vollblut isolierte Maus-PBMCs befanden. Nach dreistündiger Inkubationszeit wurden die Zellen aus dem unteren Kompartiment durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 16). Im Vergleich zur Kontrolle ohne MCP-1 migrierten bei den mit MCP-1 behandelten Endothelzellen signifikant (annähernd 5 mal) mehr CD11b⁺- und CD11c⁺-Zellen über die Endothelbarriere (Anteil der CD11b⁺- oder CD11c⁺- Zellen an allen migrierten Zellen: 1,65% ± 0,74% ohne MCP-1 und 8,16% ± 3,45% mit MCP-1).

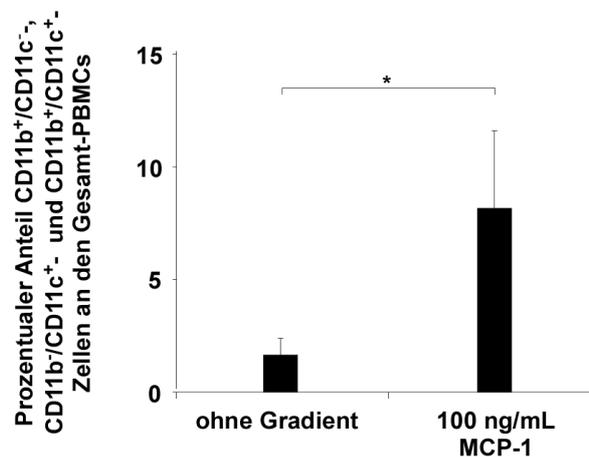


Abbildung 16: Migration von Mauszellen durch die BHS in-vitro in Abhängigkeit von einem MCP-1-Gradienten. Nach 3 Stunden Inkubation von 3×10^5 Maus-PBMCs im oberen Kompartiment und 100 ng/mL rekombinatem Maus-MCP-1 im unteren Kompartiment wurden die migrierten Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von CD11b bzw. CD11c untersucht. Für jede Versuchsbedingung wurden die Zellen von 10 - 12 Filtern verwendet. Die abgebildeten Ergebnisse fassen drei unabhängige Experimente zusammen. * $p < 0,05$

3.1.4.2 Migration infizierter Maus-PBMCs

Nachdem die funktionelle Validierung des in-vitro-Modells mit Maus-PBMCs ähnliche Ergebnisse wie die Validierung mit Ratten-PBMCs gezeigt hatte, wurden in weiteren Versuchen infizierte Mauszellpopulationen vor bzw. nach Migration näher untersucht. Im folgenden Versuchsaufbau wurden Maus-PBMCs mit *T. gondii*-Tachyzoiten des RH-Stammes in einer Ratio von 5:1 für 1 Stunde infiziert. Nachdem durch Waschschrte noch vorhandene extrazelluläre Tachyzoiten entfernt worden waren, erfolgte die Zugabe der PBMCs in das luminale Kompartiment. Nach dreistündiger

Inkubation im Brutschrank erfolgte die Analyse der in das abluminale Kompartiment migrierten Zellen.

Vor der Migration lag die Infektionsrate der CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten bei 14,05% ± 1,52% und bei ca. 9,13% ± 3,59% für CD11b⁻/CD11c⁺-DCs (Abbildung 17A). Im Vergleich dazu betrug die Infektionsrate der CD11b⁺/CD11c⁺-DCs 27,03% ± 2,31%. Nach der Migration waren signifikant weniger CD11b⁻/CD11c⁺-DCs infiziert als noch vor der Migration, während sich bei den beiden anderen Populationen die prozentuale Infektionsrate (tendenziell) erhöht hatte.

Abbildung 17B zeigt zum besseren Verständnis den Anteil infizierter CD11b⁺- bzw. CD11c⁺-Zellen an allen Zellen. Vor der Migration waren die infizierten Zellen auf alle Zellfraktionen annähernd gleichmäßig verteilt (CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten 38,62% ± 10,95%, CD11b⁻/CD11c⁺-DCs 26,53% ± 9,92% und CD11b⁺/CD11c⁺-DCs 34,85% ± 20,52%). Nach der Migration ergab sich ein signifikanter höherer Anteil an infizierten CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten (57,59% ± 18,7%) im Vergleich zu infizierten CD11b⁻/CD11c⁺-DCs (9,89% ± 2,39%).

Entsprechend waren vor Migration mehr infizierte CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten (2.589,57 ± 36,9) als CD11b⁻/CD11c⁺-DCs (1.753,52 ± 24,50) und CD11b⁺/CD11c⁺-DCs (1.932,26 ± 22) vorhanden (Abbildung 17D). Die Dominanz der CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten wurde nach der Migration noch deutlicher, da diese den größten Anteil der infizierten Zellen ausmachten (13,67 ± 9,29 CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten vs. 2,33 ± 0,58 CD11b⁻/CD11c⁺-DCs und 6,67 ± 0,58 CD11b⁺/CD11c⁺-DCs).

Die Verhältnisse der Absolutzahlen infizierter CD11b⁺/CD11c⁻-, CD11b⁻/CD11c⁺- und CD11b⁺/CD11c⁺-Zellen vor vs. nach Migration betragen 194,79, 768,47, und 316,55. Entsprechend dazu waren die Rationes der nicht infizierten CD11b⁺/CD11c⁻-, CD11b⁻/CD11c⁺- und CD11b⁺/CD11c⁺-Zellen 151,72, 164,60 und 564,14.

Bei den PBMCs, die mit *T. gondii* inkubiert aber nicht infiziert worden waren, unterschieden sich die Anteile von CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten und CD11b⁻/CD11c⁺-DCs vor der Migration nicht signifikant, lediglich der Anteil der CD11b⁺/CD11c⁺-DCs war signifikant kleiner als der der CD11b⁻/CD11c⁺-DCs. Nach der Migration war wieder kein Unterschied zwischen CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten und CD11b⁻/CD11c⁺-DCs zu erkennen, aber beide Population waren signifikant größer als die der CD11b⁺/CD11c⁺-DCs (Abbildung 17C).

Aus den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass vorwiegend infizierte CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten und CD11b⁺/CD11c⁺-DCs über das in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke wandern und die Neuroinvasion durch *T. gondii* vermitteln.

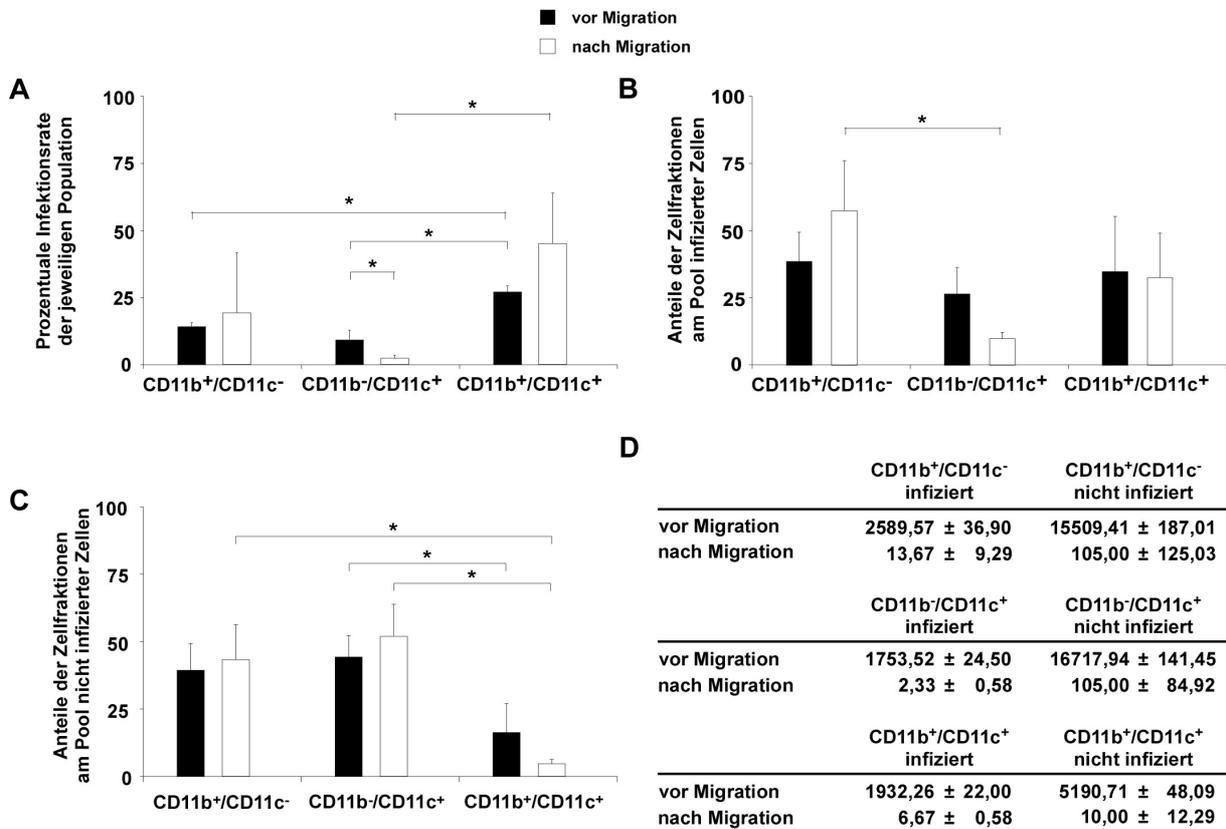


Abbildung 17: Anteil infizierter Zellen an Zellsubpopulationen nach Migration infizierter Maus-PBMCs durch die BHS in-vitro. Maus-PBMCs wurden für 2 Stunden mit GFP⁺ RH-Stamm-Tachyzoiten von *T. gondii* (Ratio 5:1) inkubiert und zum oberen Kompartiment des Transwellsystems zugegeben. Nach 3 Stunden wurden die migrierten Zellen im unteren Kompartiment mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Infektionsraten der CD11b⁺-, CD11c⁻- und doppelpositiven Zellen vor und nach Migration. (B) Anteile der CD11b⁺-, CD11c⁻- und doppelpositiven Zellen am Pool der infizierten Zellen vor und nach Migration. (C) Anteile der CD11b⁺-, CD11c⁻- und doppelpositiven Zellen am Pool der nicht infizierten Zellen aus derselben Population wie unter (B), vor und nach Migration. (D) Absolute Zellzahlen vor und nach Migration. Für jede Versuchsbedingung wurden die Zellen von 10 -12 Filtern verwendet. Die abgebildeten Ergebnisse fassen drei unabhängige Experimente zusammen. * p < 0,05

3.1.4.3 Vergleich der Migrationsraten von Maus-PBMCs nach Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten des Typ I-Stammes RH- bzw. des Typ II-Stammes ME49

In einem vergleichenden Ansatz wurde die transendotheliale Migration von Zellpopulationen untersucht, welche mit Tachyzoiten des Typ I-Stammes RH bzw. des Typ II-Stammes ME49 in einer Ratio von 3:1 für 2 Stunden inkubiert worden waren. Den Untersuchungen wurde die Gesamtheit aller CD11b⁺-, CD11c⁻- und doppelpositiven Zellen als 100%-Wert zugrunde gelegt

3.1.4.3.1 Infektionsraten der einzelnen Populationen

Vergleicht man die Infektionsraten der einzelnen Populationen vor dem Migrationsexperiment, so scheint die Infektionsrate durch den Typ II-Stamm ME49 tendenziell höher zu sein als durch den Typ I-Stamm RH. Innerhalb der RH-infizierten Zellen findet man vor der Migration eine signifikant höhere Infektionsrate für CD11b⁺/CD11c⁺-DCs im Vergleich zu CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten und CD11b⁻/CD11c⁺-DCs (Abbildung 18A). Nach Migration unterscheiden sich die Infektionsraten RH-infizierter und ME49-infizierter Populationen im direkten Vergleich nur bei den CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten in signifikanter Weise. Zudem ließ sich für den RH-Stamm eine signifikant höhere Infektionsrate bei migrierten CD11b⁺/CD11c⁺-DCs als CD11b⁻/CD11c⁺-DCs nachweisen.

3.1.4.3.2 Zusammensetzung der infizierten Zellfraktion

Nachfolgend wurde die prozentuale Zusammensetzung der durch den Typ I-Stamm RH bzw. den Typ II-Stamm ME49 infizierten Populationen untersucht. Alle infizierten Zellen wurden dabei als 100%-Wert betrachtet. Die Zusammensetzung unterschied sich im direkten Vergleich der beiden Stämme weder vor noch nach der Migration signifikant. Wie in Abbildung 18B zu sehen ist, waren in der mit RH-Tachyzoiten infizierten Population vor der Migration signifikant mehr CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten als CD11b⁻/CD11c⁺-DCs vorhanden. Vor der Migration waren in der mit ME49-Tachyzoiten infizierten Population signifikant mehr CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten als CD11b⁻/CD11c⁺-DCs und CD11b⁺/CD11c⁺-DCs enthalten; gleichzeitig war der Anteil der CD11b⁺/CD11c⁺-DCs signifikant größer als der der CD11b⁻/CD11c⁺-DCs. Nach der Migration zeigte sich in der RH-infizierten Population ein signifikant höherer Anteil an CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten und CD11b⁺/CD11c⁺-DCs als CD11b⁻/CD11c⁺-DCs, während bei ME49-infizierten Zellen diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass die Infektion von PBMCs mit dem Typ I-Stamm RH bzw. dem Typ II-Stamm ME49 keine Unterschiede bezüglich der Migrationseigenschaften bestimmter Zelltypen induzierte.

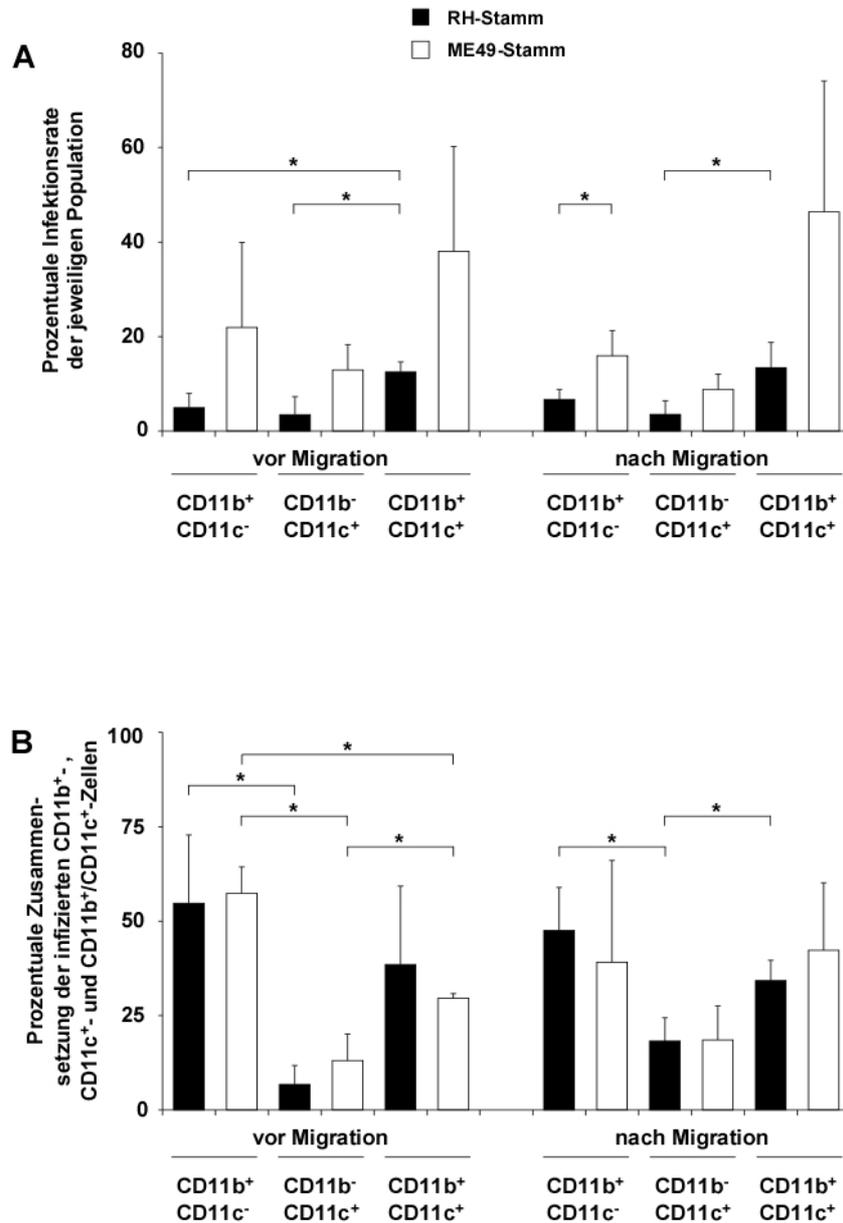


Abbildung 18: Anteil von Zellsubpopulationen nach Migration infizierter Maus-PBMCs durch die BHS in-vitro. Maus-PBMCs wurden für 2 Stunden mit GFP⁺ RH-Stamm-Tachyzoiten bzw. ME49-Stamm-Tachyzoiten von *T. gondii* (Ratio 3:1) inkubiert und dem oberen Kompartiment des Transwellsystems zugegeben. Nach 3 Stunden wurden die migrierten Zellen im unteren Kompartiment mittels Durchflusszytometrie untersucht. (A) Infektionsraten aller CD11b⁺-, CD11c⁺- und doppelpositiven Zellen vor und nach Migration. (B) Zusammensetzung aller infizierten CD11b⁺-, CD11c⁺- und doppelpositiven Zellen vor und nach Migration. Die Gesamtheit aller infizierten CD11b⁺-, CD11c⁺- und doppelpositiven Zellen wurde als 100%-Wert angesehen. Für jede Versuchsbedingung wurden die Zellen von 10 -12 Filtern verwendet. Die abgebildeten Ergebnisse fassen jeweils mindestens drei unabhängige Experimente zusammen. * p < 0,05

3.2 In-vivo-Untersuchungen zur Neuroinvasion durch *T. gondii*

3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen des Gehirns und durchflusszytometrische Analyse

Nach oraler Aufnahme von Gewebezysten oder Oozysten von *T. gondii* überwinden die daraus entlassenen Tachyzoiten die Darmbarriere und gelangen in den Blutstrom. Mittels in-vivo-Versuchen sollte geklärt werden, welche Zellsubpopulationen dabei von *T. gondii* infiziert und als Transportmittel zur Dissemination genutzt werden. Um das kurze Zeitfenster der Parasitämie näher zu untersuchen, wurden BALB/c-Mäuse intravenös mit 10^7 Tachyzoiten des RH-Stammes (GFP⁺) von *T. gondii* infiziert. Zu definierten Zeitpunkten nach Infektion wurden aus dem Gehirn mononukleäre Zellen isoliert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Der durchflusszytometrische Nachweis vermeintlicher GFP⁺-Zellen erwies sich jedoch in allen Fällen als Autofluoreszenz und nicht als infektionsbedingt (Daten sind nicht gezeigt). In keinem Fall gelang zwischen 1,5 und 96 Stunden nach Infektion der Nachweis infizierter mononukleärer Zellen im Gehirn.

Die Zahl mononukleärer Zellen im Gehirn war jedoch 96 Stunden nach Infektion im Vergleich zur Kontrolle um das 5-fache höher ($1,75 \times 10^5$ vs. $9,45 \times 10^5$ Zellen pro Gehirn) (Abbildung 19). Diese Zunahme der Zellzahl war vor allem auf das Vorhandensein von CD11b⁺-Zellen zurückzuführen, die über 95% der mononukleären Zellen ausmachten (Daten sind nicht gezeigt).

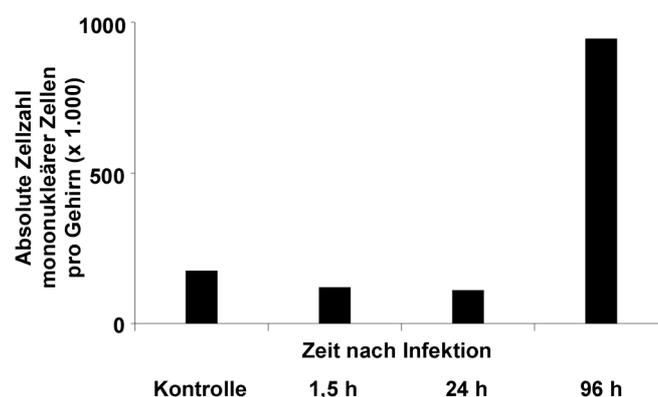


Abbildung 19: Durchflusszytometrischer Nachweis mononukleärer Zellen im Gehirn von Mäusen, die mit 10^7 Tachyzoiten intravenös infiziert worden waren.

3.2.2 Intravenöse Infektion mit extrazellulären *T. gondii*-Tachyzoiten

Um auszuschließen, dass der fehlende Nachweis von *T. gondii* im Gehirn auf einem Sensitivitätsproblem der Durchflusszytometrie beruhte, wurden in weiteren Versuchen die Gehirne infizierter Mäuse mittels quantitativer LightCycler®-Polymerase-Ketten-Reaktion (qLC-PCR) analysiert.

C57BL/6-Mäuse wurden intravenös mit GFP⁺-*T. gondii*-Tachyzoiten des RH-Stammes infiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der intravenösen Infektion wurden die Gehirne entnommen und in acht Teile unterteilt, um die primäre Eintrittsstelle von *T. gondii* ins Gehirn lokalisieren zu können und die Sensitivität der PCR zu erhöhen (weniger Hintergrund). Die Ergebnisse der qLC-PCR demonstrierten, dass Parasiten bereits 1,5 Stunden nach der intravenösen Injektion im Gehirn nachweisbar waren. Jedoch zeigte die Menge der ermittelten Parasiten-DNA (zwischen $0,54 \pm 0,94$ und $11,84 \pm 11,54$ fg/ng Gesamt-DNA) keine konstante Verteilung und die Ergebnisse waren nicht sicher reproduzierbar.

3.2.3 Intravenöse Infektion mit intrazellulären *T. gondii*-Tachyzoiten

Um auszuschließen, dass extrazelluläre Parasiten im Blut von Versuchstieren durch Serumfaktoren inaktiviert werden, wurden Infektionsversuche mit intrazellulären Parasiten durchgeführt. Durch magnetische Zellseparation wurden murine PBMCs in eine mit CD11b⁺-Zellen angereicherte (ca. 85% CD11b⁺) und eine CD11b⁻-negative Fraktion (< 6% CD11b⁺) separiert. Nach 15-stündiger Inkubation von PBMCs mit GFP⁺-Tachyzoiten des RH-Stammes (Ratio 1:1) zeigte die CD11b⁺-Zellpopulation eine deutlich höhere Infektionsrate als die CD11b⁻-Zellpopulation (44,71% vs. 10,46%, repräsentativ für einen von zwei Versuchen) (Abbildungen 20A und B). Den Versuchstieren wurden daraufhin jeweils 10.000 infizierte CD11b⁺- bzw. CD11b⁻-Zellen intravenös verabreicht. Mittels qLC-PCR wurde nach einem Tag sowohl im Gehirn von Tieren, die CD11b⁺-Zellen erhalten hatten, als auch bei Tieren, die CD11b⁻-Zellen erhalten hatten, *T. gondii*-DNA detektiert (CD11b⁺-Fraktion $0,75 \text{ fg} \pm 1,78 \text{ fg}$, CD11b⁻-Fraktion $2,11 \text{ fg} \pm 5,97 \text{ fg}$). An den Tagen drei und sieben nach der Infektion hatte sich in beiden Mausgruppen die *T. gondii*-spezifische DNA vervielfacht (CD11b⁺-Fraktion $34,06 \text{ fg} \pm 68,95 \text{ fg}$, CD11b⁻-Fraktion $37,36 \text{ fg} \pm 52,65 \text{ fg}$), es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Es ist vermutlich auf das Design des in-vivo-Modells bzw. die

unzureichende Sensitivität der Detektionsmethode zurückzuführen, dass es hier nicht wie im in-vitro-Modell möglich war, Unterschiede in der neuroinvasiven Kapazität einer bestimmten Zellpopulation zu detektieren. Diese Daten belegen jedoch, dass beide Leukozytenpopulationen in der Lage sind, *T. gondii*-Tachyzoiten durch die BHS zu transportieren.

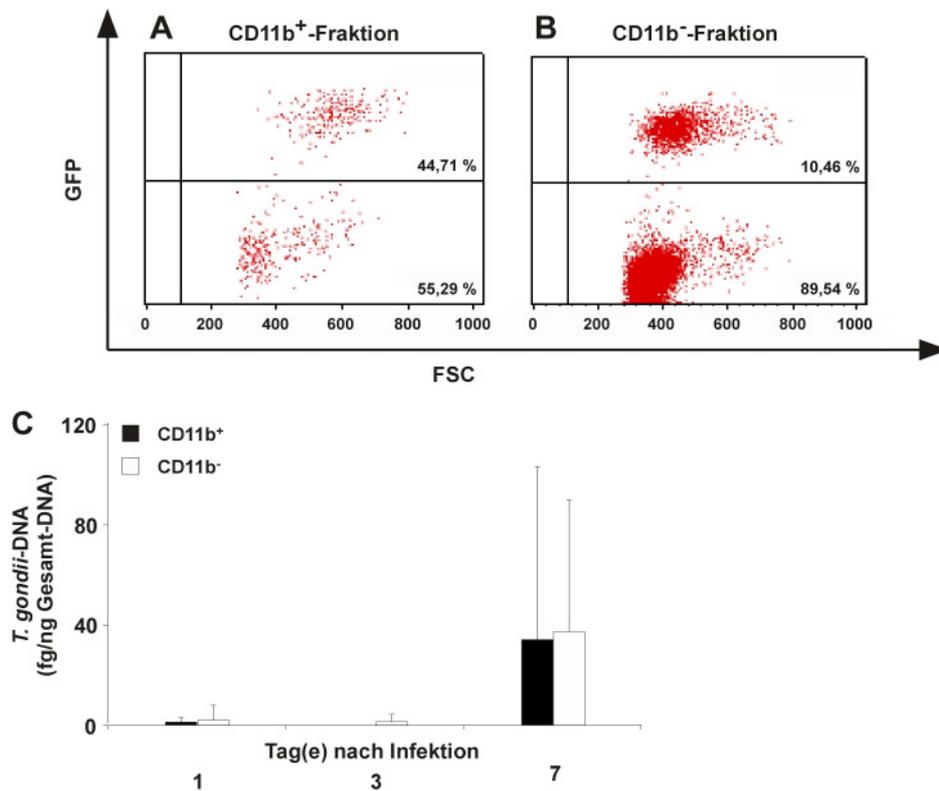


Abbildung 20: Intrazellulärer Transport von *T. gondii* in das Gehirn. Die Infektionsraten einer (A) CD11b⁺- bzw. (B) CD11b⁻-PBMC-Fraktion wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Infektion erfolgte mit GFP⁺-Tachyzoiten des RH-Stammes. Die Abbildungen (A) und (B) sind repräsentativ für je eines von zwei durchgeführten Experimenten. (C) Intravenöse Injektion von GFP⁺-Tachyzoiten des RH-Stammes, die intrazellulär in CD11b⁺- und CD11b⁻-Zellen vorlagen. Der Nachweis *T. gondii*-spezifischer DNA im Gehirn erfolgte mittels qLC-PCR einen, drei und sieben Tage nach Infektion.

4 Diskussion

Die latente Infektion mit dem Parasiten *T. gondii* zählt zu den häufigsten Infektionserkrankungen des Menschen. Nachdem der Parasit die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwunden hat, zeichnet sich eine Toxoplasma-Infektion vor allem durch die Bildung persistierender Zysten im Gehirn aus. Während in der latenten Infektionsphase die Gewebezysten der Kontrolle des Immunsystems unterliegen, kann eine Immunsuppression zu einer tödlich verlaufenden Toxoplasma-Enzephalitis führen. Zum momentanen Zeitpunkt ist nicht ausreichend geklärt, welcher Mechanismen sich der Parasit zum Eintritt in das Gehirn bedient. Es wird im Besonderen diskutiert, ob es sich dabei um intrazelluläre oder extrazelluläre Migrationsvorgänge handelt. Ein detailliertes Wissen bezüglich des Zusammenspiels von Parasiten sowie Leukozyten und Endothelzellen während der Passage der BHS könnte dabei helfen, neue Strategien zur Prävention der latenten Infektion im Gehirn zu entwickeln. Aus diesem Grund fokussiert die vorliegende Arbeit auf der Untersuchung von Molekülen und Zellen, die eine Rolle bei der Neuroinvasion durch *T. gondii* spielen könnten. Als Folge einer *T. gondii*-Infektion konnten wir in in-vitro-Versuchen große Veränderungen im Transkriptom von infizierten Hirnendothelzellen feststellen. Im Vergleich zum mausvirulenten Typ I-Stamm RH wies der mausavirulente Typ II-Stamm ME49 von *T. gondii* ein stärkeres inflammatorisches Potential auf. Zudem identifizierten wir in einem Kokultur-Transwellmodell der BHS CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten und CD11b⁺/CD11c⁺-DCs als die entscheidenden Zellpopulationen, die dem Parasiten als „Trojanisches Pferd“ die Migration über die BHS ermöglichen.

Einfluss einer Toxoplasma-Infektion auf die Immunantwort von Hirnendothelzellen

Eine Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten verändert das Genexpressionsmuster der betroffenen Zellen. Die Hoch- bzw. Herunterregulierung der Transkription bestimmter Gene dient zum Einen der Induktion einer effektiven Immunantwort gegen den Parasiten, zum Anderen kann der Parasit die Wirtsgenexpressionen zum eigenen Überlebensvorteil modulieren und beispielsweise die Apoptose von infizierten Wirtszellen verzögern [156] oder durch Manipulation von Zelladhäsionsmolekülen die Überwindung der BHS in infizierten Leukozyten forcieren [157]. In unseren

Versuchen stellte sich heraus, dass die Infektion von Endothelzellen mit *T. gondii* in die Genexpression der infizierten Zellen eingreift und Adhäsionsmoleküle wie E- und P-Selektin und ICAM-1 oder den Toll-like-Rezeptor TLR4 hochreguliert, während Signalmoleküle wie STAT4 oder Bcl-3 herunterreguliert werden.

Die verstärkte Expression von E- und P-Selektin sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 fördert die Migration von Immunzellen in das betreffende Gewebe und ist entscheidend für eine effektive Immunantwort [77, 158, 159]. Endothelzellen zeigten nach Infektion auch eine erhöhte Expression von CD40, das nach Bindung durch den T-Zell-assoziierten Liganden CD40L wiederum eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, VCAM-1 oder ICAM-1 induziert [160]. Die verstärkte Expression von TLR4 bestätigt Ergebnisse von Debierre-Grockiego et al., die berichteten, dass TLRs durch die Erkennung von Toxoplasma-Glycosylphosphatidylinositolen (GPIs) die Immunantwort verstärken können [161, 162]. Desweiteren konnte die Hochregulierung verschiedener Zytokine und Chemokine (CCL2, CCL7, CXCL1, CXCL2) gezeigt werden. Das multifunktionale Zytokin IL-6 reguliert als Akute-Phase-Protein verschiedene Aspekte der Immunantwort und Hämatopoese [163, 164], während die Chemokine CCL2, CCL7, CXCL1, CXCL2 und CX₃CL1 vor allem die chemotaktische Anlockung von Immunzellen zur Folge haben [165]. Das Oberflächenmolekül CD47 ist in die transendotheliale Migration von Leukozyten involviert, sodass die von uns beobachtete verstärkte Expression auf Endothelzellen wiederum der Migration von Immunzellen in das Gewebe dienen könnte [166]. Die Barrierefunktion der BHS beruht vor allem auf den Wechselwirkungen sogenannter Tight junction-Proteine, welche die parazelluläre Permeabilität von Epithelien regulieren [167, 168]. Eine vermehrte oder verringerte Expression dieser Proteine resultiert in Veränderungen der Barrierefunktion. Eine verminderte Expression von Claudin 8 in Hirnkapillarendothelzellen kann also als Öffnung der Barriere gedeutet werden, welche den Einstrom von Immunzellen in das Gehirn unterstützen könnte. In den Bereichen zwischen zwei aneinandergrenzenden Endothelzellen finden sich Junctional adhesion molecules (JAMs), die homophile und heterophile Bindungen mit anderen Endothelzellen aber auch Leukozyten eingehen können. So kann die Hochregulierung von JAM-2 als Mechanismus der transendothelialen Migration von Leukozyten gedeutet werden [169]. Eine verringerte Expression der proapoptotischen Effektorcaspase 3 inhibiert wiederum den programmierten Zelltod

infizierter Wirtszellen und dient so auch dem Überleben des Parasiten [156]. Der Transkriptionsfaktor STAT4 spielt eine wichtige Rolle bei der Produktion des antiparasitär wirkenden Zytokins IFN γ , sodass sich eine Herunterregulierung von STAT4 positiv auf die Proliferation des Parasiten auswirkt [170]. Im Gegensatz dazu inhibieren SOCS-Moleküle die Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren und besitzen somit wichtige immunmodulatorische Fähigkeiten, die von Pathogenen zur Immunevasion genutzt werden [171]. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Makrophagen mit *T. gondii*-Tachyzoiten zu einer SOCS-1-Überexpression führte, die wiederum die IFN γ -abhängige Signaltransduktion inhibierte [172]. Ebenso wie SOCS-1 inhibiert auch SOCS-3 die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs und die damit verbundene Transkription entsprechender Gene [173]. Dies deutet auf eine Schwächung der Immunreaktion hin, die einen temporären Überlebensvorteil für den Parasiten bedeuten kann. Dem Onkoprotein Bcl-3 wird als positiver Regulator von Nf κ B eine besondere Bedeutung beim antigenspezifischen Priming von T- und B-Zellen zugeschrieben. Bcl-3-defiziente Mäuse können dabei keine protektive Th1-zellbasierte Immunantwort aufbauen [174]. Da eine funktionierende Th1-Antwort essentiell für die Abwehr gegen eine *T. gondii*-Infektion ist, könnte die verminderte Bcl-3-Produktion der infizierten Zellen den Parasiten vor der Immunabwehr des Wirtes schützen. Zusammenfassend zeigt die Transkriptomanalyse eine deutliche Modulation von unterschiedlichen Genen, die eine wichtige Rolle beim intrazellulären Überleben des Parasiten und bei der Überwindung der BHS spielen. Obwohl einige der angeführten zellulären Mechanismen als antiparasitäre Immunreaktion des Wirtes angesehen werden können, können diese auch gleichzeitig im Sinne eines doppelschneidigen Schwertes durch die erhöhte Invasion von potentiell infizierten Leukozyten die Neuroinvasion des Parasiten in das Gehirn unterstützen.

Wie in den Transkriptomanalysen bereits nachgewiesen wurde, zeigten infizierte Zellen eine erhöhte Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche. Interessanterweise wurde dies - mit zeitlicher Verzögerung - auch auf Proteinebene bei nicht infizierten Zellen des gleichen Wells festgestellt. Die Infektion einer Endothelzelle mit dem Parasiten führte dabei zu einer höheren ICAM-1-Expression als bei nicht infizierten Zellen desselben Ansatzes. Die mit Verzögerung einsetzende Hochregulierung der ICAM-1-Expression auf nicht infizierten Zellen lässt sich am ehesten darauf zurückführen, dass infizierte Zellen initial proinflammatorische Zytokine sezernieren, die die Genexpression benachbarter, nicht infizierter Zellen im

Sinne eines Bystander-Effekts anregen. Taubert et al. konnten zeigen, dass *T. gondii* die Transkription von Genen beeinflusst, deren entsprechende Proteine immunmodulatorische Funktionen besitzen (IL-8, IP-10, MCP-1, GM-CSF, COX-2, iNOS) [175]. Auch Epithelzellen weisen nach *T. gondii*-Infektion eine vermehrte Sekretion von IL-1, IL-6 und GM-CSF sowie eine verstärkte Expression von ICAM-1 auf [176]. In anderen Modellen konnte bereits gezeigt werden, dass insbesondere proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IFN γ und IL-1 β die ICAM-1-Expression bei Zellen induzieren bzw. verstärken [148]. Das veränderte Transkriptionsprofil von ICAM-1 und die Sekretion von Zytokinen beruhen möglicherweise auf der Interaktion von protozoenspezifischen molekularen Mustern und deren Liganden auf dem Endothel [177]. Für Glycosylphosphatidylinositole von *T. gondii* wurde beispielsweise gezeigt, dass sie nach Interaktion mit den Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 die TNF α -Produktion von Makrophagen anregen [161, 162]. Ebenso gilt für die Interaktion des Toxoplasma-Cyclophilin 18 mit dendritischen Zellen, dass dieses über den Toll-like-Rezeptor 11 die Produktion von IL-12 induziert [178]. Eine verstärkte ICAM-1-Expression nach Infektion mit *T. gondii* kann durch die erhöhte transendotheliale Migration von Leukozyten einerseits eine vermehrte antiparasitäre Immunantwort zur Folge haben aber auch vermehrt infizierte Leukozyten durch die BHS transportieren. Das Parasiten-Adhäsin MIC-2 ist bekanntermaßen durch Interaktion mit ICAM-1 für die Anheftung des (extrazellulären) Parasiten selbst an Epithelien verantwortlich [144]. Somit stellt die durch *T. gondii* induzierte ICAM-1-Regulation aus endothelialer Sicht sowohl einen Vorteil als auch einen Nachteil dar. In Zusammenhang mit anderen Mechanismen der Immunevasion kann die Expression von ICAM-1 für den Parasiten als vorteilhaft zur Etablierung der latenten Infektion im ZNS angesehen werden.

Ausgehend von der Hypothese, dass Infektionen mit Typ II-Stämmen trotz der geringen Virulenz bzw. der verminderten Migrationsfähigkeit dieser Stämme [133] in einer kompensatorisch erhöhten Zytokinsekretion resultieren, wurde eine Induktion der ICAM-1-Expression und der Zytokinsekretion durch den virulenten RH-Stamm (Typ I) und den weniger virulenten ME49-Stamm (Typ II) verglichen. So berichteten Paul et al. und Robben et al. bereits, dass die Infektion von Makrophagen mit einem Typ II-Stamm eine zwei- bis dreifach höhere Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-12 zur Folge hatte als die Infektion mit einem Typ I-Stamm [179, 17], wobei die Induktion unterschiedlicher Signaltransduktionswege durch Typ I- bzw. Typ

II-Stämme vermutlich Grundlage der unterschiedlichen Virulenz ist [180, 21]. Wir beobachteten, dass die IL-6- und MCP-1-Zytokinsekretion der mit ME49-Tachyzoiten (Typ II) infizierten bEnd.3-Zellen größer war als bei einer Infektion mit RH-Tachyzoiten (Typ I) (Ratio 1:1). Die Sekretion der Zytokine stieg im zeitlichen Verlauf an, und auch der Quotient aus Zytokinkonzentration und Infektionsrate zeigte die erhöhte endotheliale Zytokinproduktion nach Infektion mit dem Typ II-Stamm ME49. Kim et al. beschreiben, dass Tachyzoiten des avirulenten Typ II-Stammes in-vitro eine stärkere proinflammatorische Antwort auslösen als virulente Typ I-Stamm-Tachyzoiten [17]. Die Induktion einer Zytokinantwort stellt für den Parasiten auf der einen Seite einen Nachteil dar (Hemmung der eigenen Replikation). Auf der anderen Seite wird aber diskutiert, dass Typ II-Tachyzoiten möglicherweise eine höhere Zytokinproduktion induzieren, um mittels der gewebezerstörenden Eigenschaften die eigene Migration durch epitheliale und endotheliale Barrieren zu forcieren. Die hohe Virulenz von Typ I-Stämmen würde demgegenüber durch die höhere Motilität und schnellere Replikation begünstigt.

Etablierung und Validierung eines in-vitro-Modells der Blut-Hirn-Schranke

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke (BHS) für Transmigrationsstudien eingesetzt, um neben Veränderungen auf Endothelzellen auch leukozytäre Mechanismen im Zusammenhang mit der Toxoplasma-Neuroinvasion zu untersuchen. Kritisch ist hierbei die Auswahl des entsprechenden in-vitro-Modells der BHS. Ein ideales Zellkulturmodell der BHS reproduziert die Verhältnisse der in-vivo-Situation möglichst genau. Nachdem Panula et al. im Jahre 1978 erstmalig die Morphologie und Histochemie primärer Rattenhirnendothelzellen in Zellkulturen beschrieben hatten [181], wurden verschiedenste in-vitro-Modelle zur Untersuchung der BHS erarbeitet. Es stellte sich heraus, dass bei Kokultur von Endothelzellen mit Astrozyten höhere transendotheliale Widerstände, geringere trans- und parazelluläre Permeabilitäten sowie eine verstärkte Expression BHS-spezifischer Enzyme und Tight junction-Proteine induziert werden konnten als bei endothelialen Monokulturen [182, 183, 184, 185]. Neben den statischen BHS-Modellen auf Transwellfiltern existieren auch dynamische BHS-Modelle, die den intraluminalen Blutfluss simulieren [186]. Die dynamischen Modelle besitzen einen stärkeren Realitätsbezug als die statischen Modelle, erfordern aber einen unverhältnismäßig hohen Kosten- und Arbeitsaufwand. Vor allem technische

Probleme wie die Gewinnung reiner Zellkulturen erschweren die Etablierung eines aus primären Zellen bestehenden in-vitro-Modells. Die Präparation der Zellen erweist sich hierbei häufig als zeitaufwändig und teuer, da primäre Zellen nach der Präparation oft nur eine kurze (Über-)Lebensdauer von wenigen Stunden bzw. Tagen besitzen. Zudem kann die Präparation selbst charakteristische Eigenschaften der Zellen zerstören. Obwohl es nahezu unmöglich ist, den Einfluss des Immunsystems und andere metabolische Effekte in-vitro exakt zu simulieren, besitzt ein Zellkulturmodell gegenüber Tierversuchen jedoch entscheidende Vorteile wie eine hohe Reproduzierbarkeit oder die Möglichkeit, definierte Parameter nach Wunsch beeinflussen und untersuchen zu können. Für die vorliegende Arbeit wurde deshalb ein in-vitro-Modell der BHS ausgewählt, welches sich aus primär isolierten Rattenhirnkapillarendothelzellen und Rattenhirngliazellen zusammensetzt [136]. Bei in-vitro-Modellen der BHS wird häufig primären Zellkulturen der Vorzug gegeben, da Zelllinien nach mehrmaligem Passagieren dazu neigen, sich zu dedifferenzieren (Angaben gemäß Firma ATCC). Während aufgereinigte Rattenendothelzellen in Kokultur mit Astrozyten eine Barriere mit geringer Permeabilität und hohem transendothelialen elektrischen Widerstand ausbilden ($TEER \sim 200 \Omega \times cm^2$) [185, 137, 136], ist dies bei Modellen unter Verwendung von murinen Zellen nicht der Fall ($TEER 30 - 40 \Omega \times cm^2$) [187]. BHS-Modelle auf der Basis von Schweine- oder Rinderhirnendothelzellen zeigen zwar deutlich höhere TEER-Werte als das bei Maus- oder Rattenmodellen der Fall ist (bis zu $800 \Omega \times cm^2$) [188, 189], jedoch wären anschließende in-vivo-Versuche mit Schweinen oder Rindern unter den gegebenen Bedingungen nicht durchführbar gewesen.

Bevor das Modell zur Untersuchung von Migrationsvorgängen im Rahmen einer Toxoplasma-Infektion an der BHS eingesetzt wurde, erfolgte eine detaillierte Validierung des Systems. Lichtmikroskopisch wurden Zellkomponenten auf charakteristische Merkmale hin untersucht, um die Reinheit des endothelialen Monolayers zu überprüfen. Die freie Diffusion von Molekülen und Zellen über diese Endothelzellschicht wird durch Tight junction-Proteine wie ZO-1 und Occludin unterbunden [190, 191]. Diese Proteine konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie an den eingesetzten Kapillarendothelzellen nachgewiesen werden und sind ein zusätzlicher Hinweis für eine intakte Endothelzellbarriere. Um die Aufrechterhaltung der BHS-Funktion zu gewährleisten, sind die Mikrokapillaren im Gehirn von Astrozytenausläufern umgeben. Aus diesem Grund wurden die isolierten primären

Endothelzellen in einem Kokulturmodell zusammen mit primären Gliazellen kultiviert. Die weitere Validierung des Systems bestand aus biophysikalischen und funktionellen Messungen, wobei der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER), die Permeabilität von Tracermolekülen (Albumin bzw. Natriumfluoreszein) und die Induktion bzw. Blockade der Zellmigration untersucht wurden. Die Permeabilitätsmessungen wiesen das Kokulturmodell als Barriere für die trans- und parazellulären Tracersubstanzen aus. Auch der hohe transendotheliale Widerstand war charakteristisch für die Barrierefunktion der in-vitro-BHS [138, 136]. Zudem konnte die Migration von Zellen über die endotheliale Zellschicht durch einen MCP-1-Gradienten gefördert bzw. durch die Zugabe von blockierenden Antikörpern nahezu komplett unterbunden werden. Dies entspricht Ergebnissen von Weiss et al., die anhand eines Transwell-Modells ebenfalls eine verstärkte Migration von Monozyten in Richtung des Chemokins MCP-1 festgestellt haben [58]. Zusätzlich zur chemotaktischen Eigenschaft des MCP-1 sollte aber jeweils auch dessen Einfluss auf die Permeabilität von Endothelzellbarrieren bedacht werden [192]. In der Arbeit von Weiss et al. wurde das Kokultursystem zusätzlich mit TNF α vorbehandelt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultierte die Stimulation in einer im Vergleich zur Kontrolle verstärkten Monozytenmigration. Jedoch ist zu bemerken, dass für die vorliegende Arbeit aus physiologischen Gründen nur ein Stimulationszeitraum von 3 Stunden und nicht 16 Stunden gewählt wurde [58]. Zusammengenommen zeigen die erhaltenen Messwerte, dass das verwendete in-vitro-Modell der BHS charakteristische Eigenschaften der BHS in-vivo besitzt, eine modulierbare Barriere für Leukozyten darstellt und sich somit für die Untersuchungen zur Leukozytenmigration eignet.

Extrazelluläre und intrazelluläre Dissemination von *Toxoplasma gondii*

Nach der oralen Aufnahme von Oozysten oder Gewebezysten infiziert der Parasit zuerst Enterozyten des Darmes und verteilt sich von dort ausgehend über den gesamten Wirtsorganismus [193]. Noch immer wird darüber debattiert, ob *T. gondii* als extrazellulärer Parasit oder in infizierten Leukozyten durch den Körper disseminiert und dabei die verschiedenen epithelialen und endothelialen Zellbarrieren überwindet.

Barragan et al. bedienten sich sowohl eines in-vitro- als auch eines ex-vivo-Modells, um die extrazellulären Migrationskapazitäten von *T. gondii* zu untersuchen [133].

Dabei stellte sich heraus, dass extrazelluläre Tachyzoiten neben polarisierten Zellschichten und extrazellulärer Matrix Dünndarmepithelien auch durch aktive Migration überqueren können. Tachyzoiten des Typ I-Stammes zeigten dabei stärkere migratorische Kapazitäten als Tachyzoiten des Typ II- bzw. des Typ III-Stammes. Es wird zudem postuliert, dass Tachyzoiten die Zellbarrieren auf einem parazellulären Weg überwinden können [144]. Sporozoiten von Plasmodien kommen während ihrer Verteilung im Wirt teilweise in einer extrazellulären Form vor und disseminieren durch eigene Motilität bzw. werden mit Hilfe von Körperflüssigkeiten transportiert [128]. Trypanosomen, Amöben sowie *Candida albicans* scheinen als extrazelluläre Erreger ins Gehirn vorzudringen, indem sie zuerst zerebrale Endothelzellen infizieren und anschließend über die abluminale Seite der Kapillaren Zugang zum Hirnparenchym erlangen [194, 195, 119]. Obwohl das ZNS als „immunologisch privilegiert“ gilt, verschaffen sich verschiedene neurotrope und neurovirulente Pathogene, mit Hilfe von Wirtszellen im Sinne eines „Trojanischen Pferdes“ Zutritt zum Gehirn. Drevets et al. konnten zeigen, dass Listerien bevorzugt CD11b⁺ und Ly6C⁺ mononukleäre Zellen infizieren und in diesen vermutlich die BHS überqueren [125, 126]. Auch das HI-Virus und *Cryptococcus neoformans* machen sich monozytäre Zellen zur Dissemination in das Gehirn zu Nutze [196, 197, 198, 199]. Listerien und Aspergillen benutzen ebenso DCs als Vehikel, um sich im Körper des Wirtes auszubreiten [200, 201].

Einfluss einer Toxoplasma-Infektion auf die Migrationskapazität von Leukozyten durch ein in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke

Die Zuordnung von Leukozyten zu einer bestimmten Zellpopulation wird dadurch erschwert, dass in vielen Arbeiten unterschiedliche Kriterien zur Bestimmung dieser Zellen angewendet wurden und antigenpräsentierende Zellen im Laufe ihrer Reifung und Aktivierung die Expression charakteristischer Oberflächenmarker verändern können. Gerade Monozyten und dendritische Zellen stellen eine zum Teil sehr heterogene Zellpopulation dar, sodass zur Abgrenzung einzelner Subpopulationen die Kombination mehrerer Oberflächenmarker nötig ist.

Als charakteristischer Marker für Monozyten wird häufig das Protein CD11b verwendet, dendritische Zellen (DCs) werden als CD11c⁺-Zellen definiert. Doppeltpositive (CD11b⁺/CD11c⁺) Zellen scheinen einer speziellen Subpopulation dendritischer Zellen (DCs) anzugehören. Mit Hilfe eines kombinierten Antikörpers

konnten bei Versuchen mit Rattenzellen beide Zellpopulationen zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen zusammengefasst und untersucht werden (anti-CD11bc-Antikörper). Das Oberflächenmolekül CD45 gilt als Pan-Leukozytenmarker. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgrund der Limitationen in der regulären Durchflusszytometrie (zwei Laser) maximal vier Oberflächenmarker untersucht. Um mehr als vier Marker zeitgleich zu untersuchen, bedarf es zum einen spezialisierter Durchflusszytometer (mehr als zwei Laser). Zum anderen wird bei steigender Zahl an Oberflächenmarkern die Kompensation der einzelnen Chromophoren, insbesondere bei geringen Zellzahlen, äußerst schwierig, in einigen Fällen nahezu unmöglich.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass die Infektion von peripheren Ratten-CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen (antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten und DCs) mit *T. gondii* deren Migrationsvermögen wesentlich stärker erhöhte als bei infizierten CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen (B- und T-Lymphozyten). Während auf der luminalen Seite annähernd gleich viele infizierte CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen und CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen vorhanden waren, wurden in der Population der migrierten Zellen 8-mal so viele CD45⁺/CD11bc⁺- wie CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen detektiert. Zusätzlich war die Infektionsrate der CD45⁺/CD11bc⁺-Population nach Migration um den Faktor 5 höher als vor der Migration. Dies entspricht zudem einer 18-fach höheren Infektionsrate im Vergleich zu den migrierten CD45⁺/CD11bc⁻-Lymphozyten. Ebenso beschreiben Courret et al., dass *T. gondii* CD11b⁺- und CD11c⁺-Zellen bereits in der Peripherie des Körpers infiziert und zum Transport in das Gehirn nutzt [130]. Channon et al. konnten zeigen, dass die Infektion von Leukozyten durch *T. gondii* in dosisabhängiger Weise erfolgt und bevorzugt monozytäre Zellen und DCs betrifft [202]. Limitationen bei der Verwendung von Rattenzellen für diese Tests bestanden allerdings in der eingeschränkten Zahl von zellspezifischen Antikörpern, sodass nicht zwischen CD11b⁺- und CD11c⁺-Zellen unterschieden werden konnte. Um den Mangel an rattenspezifischen Antikörpern zu umgehen, fanden die weiteren Versuche unter Verwendung von Maus-PBMCs im Ratten-Kokultur-Modell der BHS statt. In Vorversuchen konnten wir zeigen, dass die Speziesunterschiede keinen Einfluss auf die Migrationsversuche hatten. Es war nun möglich, zwischen Subpopulationen der CD11b⁺-, CD11c⁺- und doppelpositiven Zellen zu unterscheiden. Die CD11b⁺/CD11c⁺-DCs zeigten sowohl vor als auch nach der Migration die höchste Infektionsrate. Es muss bedacht werden, dass die CD11b⁺/CD11c⁺-DCs (wie CD11c⁺-Zellen im Allgemeinen) zahlenmäßig eine

verhältnismäßig kleine Zellpopulation im Blut darstellen (ca. 2 %; CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten hingegen ca. 20%). Allerdings scheint der Parasit eine hohe Affinität zu den CD11b⁺/CD11c⁺-DCs zu besitzen. Bierly et al. beobachteten eine den plasmazytoiden DCs (pDCs) ähnliche Population, welche die Markermoleküle CD11c, CD11b, Gr-1 und PDCA-1 koexprimiert und unter den *T. gondii*-infizierten Zellen der Milz in großer Zahl zu finden ist [203]. Die Erklärung für diesen einzigartigen Phänotyp scheint in einer Übergangsphase zwischen pDCs und DCs begründet zu sein, welche unter inflammatorischen Bedingungen eintritt.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich im Weiteren ersehen, dass die Zusammensetzung der infizierten Zellen nach Migration von CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten dominiert wurde. Obwohl die Infektionsrate der CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten geringer als bei den zuvor erwähnten CD11b⁺/CD11c⁺-DCs ausfiel, waren die CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten diesen aufgrund ihrer Populationsgröße überlegen. Courret et al. zeigten ebenfalls, dass im Blut infizierter Tiere vor allem CD11b⁺-Zellen als Reservoir für *T. gondii* dienen. Im Gehirn infizierter Tiere fand eine deutliche Akkumulation von CD11b⁺-Zellen statt, die circa 50% aller aus der Peripherie eingewanderten Zellen umfasste. Zusammen mit den eingewanderten CD11c⁺-Zellen machten diese beiden Leukozytenpopulationen 60% aller in das Gehirn migrierten Zellen aus [130]. Auch andere Arbeitsgruppen untermauern die These, dass infizierte antigenpräsentierende Zellen eine Rolle bei der Dissemination des Parasiten *T. gondii* spielen. Humane DCs werden nach Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten in einen Zustand der „Hypermotilität“ versetzt und wandern, ohne dass ein chemotaktischer Stimulus benötigt wird. Auch die Inokulation von Mäusen mit infizierten DCs bestätigte die Beobachtung einer stark erhöhten Migrationsfähigkeit dieser Zellen [155]. Interessanterweise scheint die verstärkte Migrationskapazität infizierter antigenpräsentierender Zellen in der frühen Infektionsphase nicht mit einer Hochregulierung leukozytenspezifischer Adhäsionsmoleküle einher zu gehen [155, 204]. Unno et al. verglichen die neuroinvasive Kapazität von intrazellulären Tachyzoiten mit der von extrazellulären Tachyzoiten. Nach intravenöser Applikation gleicher Mengen an GFP⁺-extrazellulären und RED⁺-intrazellulären Parasiten konnten nur wenige der extrazellulär injizierten Parasiten im Gehirn detektiert werden. Die intrazellulär applizierten Parasiten waren im Gehirn dagegen in großen Mengen vorhanden [205]. Eine extrazelluläre Dissemination des Parasiten würde zwangsläufig zum Kontakt mit Serumkomponenten wie Immunglobulinen, u. a. auch

natürlich vorkommenden anti-Toxoplasma-Immunglobulinen, führen, die nach Bindung über das Komplementsystem zur Lyse des Parasiten beitragen können [206].

Monozytäre Zellen des peripheren Blutes unterscheiden sich nicht nur in der Expression bestimmter Antigenmarker, sondern auch durch ihre jeweilige physiologische Aktivität. Dabei können Monozyten anhand von Chemokinrezeptoren oder CD-Oberflächenantigenen in inflammatorische bzw. residente Zellen eingeteilt werden. Während residente Monozyten $CD11b^+$, $CCR2^-$, CX_3CR1^{hi} , $CD62L^-$ sowie $Ly6C^-$ sind, ist die Expression von $CCR2$ und die Migration in Richtung des $CCL2$ -Gradienten in einem Entzündungsgebiet charakteristisch für inflammatorische Monozyten ($CD11b^+$, $CCR2^+$, CX_3CR1^{low} , $CD62L^+$, $Ly6C^+$) [207]. Nakano et al. stellten fest, dass nach viraler Infektion inflammatorische Monozyten vom Blut zu den Lymphknoten rekrutiert werden. Diese entwickeln sich daraufhin zu sogenannten inflammatorischen DCs, die die Marker $CD11c$, $CD11b$ und $Gr-1$ exprimieren [208]. Die in der vorliegenden Arbeit erwähnte $CD11b^+/CD11c^+$ -Zellpopulation lässt sich dem Phänotypen nach möglicherweise den inflammatorischen DCs zuordnen, während die $CD11b^+/CD11c^-$ -Zellen den inflammatorischen Monozyten entsprechen könnten.

Beim Vergleich der leukozytären Migrationskapazität nach Infektion mit einem Typ I- bzw. einem Typ II-Stamm von *T. gondii* fällt die durch den avirulenten Typ II-Stamm bedingte höhere Infektionsrate bei Leukozyten auf. Wenn auch teilweise signifikant, so messen wir diesem transienten Phänomen keine biologische Bedeutung bei. Die qualitative Zusammensetzung der infizierten Zellen vor und nach Migration unterschied sich bei beiden Stämmen nicht. Lambert et al. beobachteten, dass Leukozyten, die mit einem Typ II-Stamm von *T. gondii* infiziert wurden, eine stärkere Migration zeigen, wobei Genotyp-assoziierte Unterschiede nicht auf unterschiedliche Infektionsraten zurückzuführen sind [134]. Unsere Versuche im in-vitro-Modell der BHS weisen nicht auf eine präferentielle Migration von einzelnen Zelltypen nach Infektion mit Typ I- bzw. Typ II-Tachyzoiten hin.

Untersuchungen zur Neuroinvasion von *Toxoplasma gondii* im Tiermodell

Mit Hilfe eines in-vivo-Versuchsansatzes sollten die in-vitro erhaltenen Ergebnisse zur Bedeutung von $CD11b^+$ -Zellen bei der Neuroinvasion durch *T. gondii* bestätigt werden. Die intravenöse Injektion von *T. gondii*-infizierten $CD11b^+$ - bzw. $CD11b^-$ -

Zellen resultierte jedoch nicht in einem signifikanten Unterschied in der Toxoplasma-DNA-Konzentration im Gehirn der Mäuse. Grund für das Fehlen einer messbaren präferentiellen in-vivo-Migration durch CD11b⁺-Zellen könnte die mangelnde Sensitivität der Detektionsmethode bzw. des Versuchsaufbaus sein. Mittels Fluoreszenzintensitätsmessungen in der Durchflusszytometrie konnte nicht sicher geklärt werden, mit wievielen Parasiten eine Wirtszelle infiziert war, da die Fluoreszenzintensität eines einzelnen Parasiten vergleichsweise schwach und die Methode nicht ausreichend sensitiv ist. Um dieses Problem zu umgehen, sollte für weitere Versuche exemplarisch die Anzahl an Parasiten pro Zelle mit einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Denkbar wäre also, dass zumindest einige CD11b⁻-Zellen mit mehr als einem Parasiten pro Zelle infiziert worden waren und so trotz geringerer neurotroper Aktivität eine den CD11b⁺-Zellen vergleichbare Anzahl an Parasiten in das Gehirn transportieren konnten. Da die prozentuale Infektionsrate der CD11b⁻-Zellen geringer war als die der CD11b⁺-Zellen, mussten in der CD11b⁻-Fraktion im Vergleich zur CD11b⁺-Fraktion auch mehr nicht infizierte Zellen und extrazelluläre Tachyzoiten verabreicht werden, um bei beiden Gruppen dieselbe Menge an infizierten Zellen zu applizieren. Zwar geht aus dieser Arbeit und den Ergebnissen von Unno et al. hervor, dass selbst die Injektion großer Mengen an extrazellulären Parasiten nicht zu einer reproduzierbaren und signifikanten Neuroinvasion führt [205]. Jedoch könnte in der mit CD11b⁻-Zellen behandelten Gruppe die größere Menge an extrazellulären Parasiten bzw. nicht infizierten Leukozyten eine verstärkte Öffnung der BHS induziert und so den Übertritt von infizierten Leukozyten in das Gehirn erleichtert haben. Es lässt sich aber festhalten, dass die Injektion intrazellulärer Parasiten im Gegensatz zur Injektion extrazellulärer Parasiten den Nachweis parasitärer DNA im Gehirn ermöglichte, was unsere These zur intrazellulären Neuroinvasion durch *T. gondii* bestätigt.

Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Parasit *T. gondii* die Genexpression infizierter Wirts-Hirndothelzellen moduliert, um möglicherweise durch die vermehrte Bildung von Adhäsionsmolekülen sowie der Sekretion von Chemokinen die transendotheliale Migration intrazellulärer Parasiten zu unterstützen. CD11b⁺/CD11c⁺-DCs sind als Toxoplasma-Shuttle von Interesse, da diese kleine Zellpopulation eine besonders hohe Infektionsrate aufweist. Die

CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten wiederum dominierten zahlenmäßig die infizierten CD11b⁺-, CD11c⁺- und doppelpositiven Zellen vor und nach den Migrationsexperimenten und sind aus diesem Grund ebenfalls wichtige Kandidaten für den Toxoplasma-Transport in das Gehirn. Es ist wahrscheinlich, dass diese Zellen durch die Infektion in einen hypermotilen Zustand versetzt werden, und so dem Parasiten dabei helfen, sich im Wirtsorganismus zu verbreiten.

Diese Ergebnisse erweitern die Kenntnisse zur Interaktion von *T. gondii* mit Wirtszellen der BHS und werden hilfreich für zukünftige Arbeiten zur Neuroinvasion des Parasiten sein. Weiterführende Arbeiten sollten die neuroinvasive Kapazität intrazellulärer Tachyzoiten noch eingehender untersuchen. Beispielsweise könnte unter Zuhilfenahme von Oberflächenmarkern wie CCR2, CX₃CR1, CD11b, CD62L, Ly6C bzw. GR-1 (entspricht der Kombination Ly6G/Ly6C) die Identität der inflammatorischen Monozyten bzw. inflammatorischen DCs en detail bestätigt werden. Der Einfluss bestimmter Parasitenmoleküle auf die Neuroinvasion könnte mit Hilfe von Toxoplasma-Mutanten untersucht werden. Als alternatives in-vivo-Modell wäre denkbar, Tiere mit einem induzierbaren CD11b- bzw. CD11c-Gendefekt [209, 210] oral mit *T. gondii* zu infizieren und zu verschiedenen Zeitpunkten die Menge an Parasiten im Blut und dem Gehirn zu messen. Neben der quantitativen DNA-Bestimmung könnten auch histologische und immunhistochemische Untersuchungen zum Einsatz kommen, um inflammatorische Vorgänge im Gehirn besser detektieren und untersuchen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Infektion mit dem ubiquitär vorkommenden Parasiten *Toxoplasma gondii* kann bei immunsupprimierten Menschen eine lebensbedrohliche Enzephalitis hervorrufen. Nach oraler Aufnahme disseminiert der Parasit über das Blut im Körper seines Wirtes und erreicht so auch vermeintlich entfernte und geschützte Organe wie das Gehirn. Um die der Dissemination zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit sowohl endotheliale als auch leukozytäre Faktoren der Interaktion des Wirtes mit dem Parasiten untersucht. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Infektions- und Modulationskapazität des Typ I-Stammes RH sowie des Typ II-Stammes ME49 von *T. gondii*, welche sich hinsichtlich ihrer Virulenz unterscheiden. Der Typ I-Stamm gilt dabei als mausvirulent, der Typ II-Stamm hingegen als mausavirulent. Bei Hirnendothelzellen wurde deren Fähigkeit untersucht, als Folge einer Toxoplasma-Infektion Zytokine zu sezernieren bzw. Oberflächenmoleküle zu exprimieren. Eine zusätzliche Fragestellung war hierbei, ob die jeweiligen endothelialen Reaktionen die Wirtsabwehr unterstützen oder vielmehr die Dissemination des Parasiten vorantreiben.

Microarray-Experimente zeigten unter anderem eine Hochregulierung von Chemokingenen (CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CXCL1/GRO-1, CXCL2/GRO-2, CX₃CL1/Fraktalkine) und eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, JAM-2, E-Selektin, P-Selektin), welche im Rahmen einer Immunantwort die transendotheliale Migration von Leukozyten zum Ort der Inflammation fördern. Ebenso können aber auch Toxoplasma-infizierte Leukozyten mit Hilfe der Chemokine und Adhäsionsmoleküle einfacher in das Gehirn eindringen.

Mittels Durchflusszytometrie und ELISA wurde gezeigt, dass infizierte Endothelzellen eine höhere ICAM-1-Expression aufweisen als nicht infizierte Zellen. Zusätzlich führte eine Infektion mit *T. gondii* zur Sekretion des Zytokins IL-6 und des Chemokins MCP-1. In beiden Fällen induzierte der Typ II-Stamm ME49 eine stärkere zelluläre Antwort als der Typ I-Stamm RH.

Mit Hilfe eines in-vitro-Modells der Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurde die Migrationskapazität von naiven und infizierten PBMCs untersucht. Erste Experimente mit Ratten-PBMCs ließen darauf schließen, dass infizierte CD45⁺/CD11bc⁺-Zellen (antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten und dendritische Zellen) im Vergleich zu CD45⁺/CD11bc⁻-Zellen (B- und T-Lymphozyten) in einen besonders motilen

Zustand versetzt werden und in bevorzugtem Maße durch das BHS-Modell migrieren.

Durch den Einsatz von Maus-PBMCs konnte diese monozytäre/dendritische Zellpopulation näher untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass *T. gondii* unter den CD11b⁺-, CD11c⁺- und doppelpositiven antigenpräsentierenden Zellen eine besondere Affinität zu der zahlenmäßig kleinen Population der CD11b⁺/CD11c⁺-DCs (~ 2% der CD11b⁺-, CD11c⁺- und doppelpositiven Zellen) besitzt, da diese Zellen zu einem hohen Prozentsatz infiziert worden waren. Betrachtet man jedoch alle infizierten CD11b⁺-, CD11c⁺- und doppelpositiven Zellen, so wurden diese nach den Migrationsexperimenten von infizierten CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten dominiert. Wir postulieren, dass es sich bei den CD11b⁺/CD11c⁻-Zellen um sogenannte inflammatorische Monozyten und bei den CD11b⁺/CD11c⁺-Zellen um inflammatorische DCs handelt.

Aus unseren Ergebnissen geht also hervor, dass monozytäre und dendritische Zellen eine Funktion als Toxoplasma-Shuttle für das Gehirn besitzen, da diese Zellen hohe Infektionsraten aufweisen und in Folge einer Toxoplasma-Infektion verstärkte migratorische Eigenschaften besitzen.

Eine Bestätigung unserer in-vitro-Daten mit Hilfe eines in-vivo-Modells gelang jedoch nicht. Nach der intravenösen Applikation von RH-Stamm-infizierten CD11b⁺- bzw. CD11b⁻- Zellpopulationen konnte im Gehirn der Mäuse kein Unterschied bezüglich der Menge an vorhandener Toxoplasma-DNA festgestellt werden. Trotzdem führte die Injektion von intrazellulären Parasiten zum reproduzierbaren Nachweis von parasitärer DNA im Gehirn der Versuchstiere. Dies war nach Injektion extrazellulärer Erreger nicht möglich gewesen und stützt unsere Hypothese, dass die Neuroinvasion von *T. gondii* auf dem Transport durch infizierte Zellen beruht.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass *T. gondii* die Genexpression infizierter Wirtsendothelzellen modifizieren kann, um daraus Vorteile für die eigene Dissemination zu ziehen. Zusätzlich dazu postulieren wir, dass CD11b⁺/CD11c⁻-Monozyten und CD11b⁺/CD11c⁺-DCs bei der Neuroinvasion durch den Parasiten *T. gondii* die Rolle eines „Trojanisches Pferdes“ übernehmen.

6 Summary

Toxoplasmic encephalitis is a life threatening disease in immunocompromised patients caused by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Following oral ingestion the parasite disseminates in the host and infects even distant sites of the body including the brain. The early events that enable the parasite to cross the blood-brain barrier are poorly understood and it remains to be shown whether neuroinvasion by the parasite occurs mainly intracellularly or extracellularly. To further understand the mechanisms of neuroinvasion we investigated the interaction between the parasite and endothelial cells and the role of leukocytes as Trojan horses in neuroinvasion. In addition, differences in the effects on endothelial cells and leukocytes by type I strain RH and type II strain ME49 were compared.

First, changes in the regulation of the transcriptome of brain endothelial cells were investigated using whole genome microarrays. Among others the upregulation of chemokines (CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CXCL1/GRO-1, CXCL2/GRO-2, CX₃CL1/fractalkine) and adhesion and junctional molecules (E-selectin, P-selectin, ICAM-1, JAM-2) was observed pointing towards a role for immune cells in neuroinvasion. Secondly, a significantly higher expression of ICAM-1 was observed in *T. gondii*-infected cells compared to uninfected cells in the same well and infection with *T. gondii* resulted in a marked secretion of IL-6 and MCP-1 by brain endothelial cells; these observations were more pronounced in cells infected with the type II strain compared to cells infected with the type I strain.

Finally, using an in-vitro co-culture model of the BBB, we examined the migratory capacities of infected and uninfected PBMCs. Preliminary experiments with rat PBMCs identified a stronger migratory capacity of infected CD45⁺/CD11b^c⁺ cells (antigen presenting cells such as monocytes and dendritic cells) compared to CD45⁺/CD11b^c⁻ cells (B- and T-lymphocytes). Using murine cells, we determined that the small population of CD11b⁺/CD11c⁺ DCs (~ 2%) presents the most preferably infected cells amongst all CD11b⁺, CD11c⁺ and double positive cells. Nevertheless, CD11b⁺/CD11c⁻ monocytes were the predominant infected cell population after migration; furthermore, type I or type II strains of *T. gondii* were similar in their impact on the antigen presenting cell population before and after migration. Thus, CD11b⁺/CD11c⁻ and CD11b⁺/CD11c⁺ cells may be the cells that serve as shuttles in

the transport of *T. gondii* across the BBB. CD11b⁺/CD11c⁻ cells could possibly be classified as inflammatory monocytes while CD11b⁻/CD11c⁺ cells may represent inflammatory DCs.

Whereas the injection of in-vitro infected CD11b⁺ or CD11b⁻ cells resulted in the detection of parasite DNA in mouse brains, injection of extracellular parasites did not lead to the reproducible detection of Toxoplasma DNA. However, parasite concentrations in brains did not differ between mice that received CD11b⁺ vs. CD11b⁻ cells.

In conclusion, *T. gondii* seems to modulate the gene expression of brain endothelial cells of the host to promote its dissemination as an intracellular parasite. CD11b⁺/CD11c⁻ and CD11b⁺/CD11c⁺ cells are most likely candidate cells for the intracellular passage of *T. gondii* across the BBB in a Trojan Horse-like manner.

7 Literatur

- [1] Dubey JP. *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan: perspectives and methods. Weiss LM, Kim K, editors. Academic Press; 2007.
- [2] Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*. 2004 Mar;34(3):423–432.
- [3] Mehlhorn H, Piekarski G. *Grundriß der Parasitenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin. 2002;6. Auflage.
- [4] Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Mar;104(2):364–369.
- [5] Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Sep;64(3):607–623.
- [6] Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol*. 1998 Jan;6(1):27–30.
- [7] Lingelbach K, Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci*. 1998 Jun;111 (Pt 11):1467–1475.
- [8] Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Apr;11(2):267–299.
- [9] Schlüter D. Spiele, die Parasiten mit uns treiben. *Lehren der Toxoplasmose*. *Magdeburger Wissenschaftsjournal*. 2004;2:21–28.
- [10] Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1970 Dec;157(11):1767–1770.
- [11] Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med*. 1970 Oct;132(4):636–662.
- [12] Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 1970 Feb;167(3919):893–896.
- [13] Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009 Sep;364(1530):2749–2761.

- [14] Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol.* 2002 Aug;5(4):438–442.
- [15] Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995 Dec;172(6):1561–1566.
- [16] Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1997 Jun;35(6):1411–1414.
- [17] Kim L, Butcher BA, Lee CW, Uematsu S, Akira S, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. *J Immunol.* 2006 Aug;177(4):2584–2591.
- [18] Saeij JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* 2005 Oct;21(10):476–481.
- [19] Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 2003 Sep;11(9):426–430.
- [20] Saeij JPJ, Boyle JP, Collier S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, et al. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science.* 2006 Dec;314(5806):1780–1783.
- [21] Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, et al. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science.* 2006 Dec;314(5806):1776–1780.
- [22] Araujo FG, Slifer T. Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. *Infect Immun.* 2003 Jul;71(7):4171–4174.
- [23] Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol.* 2008 Oct;38(12):1359–1370.
- [24] Afonso E, Lemoine M, Poulle ML, Ravat MC, Romand S, Thulliez P, et al. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in an urban area. *Int J Parasitol.* 2008 Jul;38(8-9):1017–1023.
- [25] Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004 Dec;126(1-2):57–72.

- [26] Craeye SD, Francart A, Chabauty J, Vriendt VD, Gucht SV, Leroux I, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Belgian house cats. *Vet Parasitol*. 2008 Oct;157(1-2):128–132.
- [27] Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004 Jun;363(9425):1965–1976.
- [28] Derouin F, Pelloux H, on Clinical Parasitology ESCMIDSG. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Dec;14(12):1089–1101.
- [29] Siegel SE, Lunde MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, et al. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood*. 1971 Apr;37(4):388–394.
- [30] Räisänen SA. The importance of trophozoites in transmission of toxoplasmosis: survival and pathogenity of *Toxoplasma gondii* trophozoites in liquid media. *Med Hypotheses*. 1978;4(4):367–375.
- [31] Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):659–88.
- [32] Dannemann B, McCutchan JA, Israelski D, Antoniskis D, Leport C, Luft B, et al. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann Intern Med*. 1992 Jan;116(1):33–43.
- [33] Grant IH, Gold JW, Rosenblum M, Niedzwiecki D, Armstrong D. *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS. *AIDS*. 1990 Jun;4(6):519–521.
- [34] Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992 Aug;15(2):211–222.
- [35] Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 2008 Aug;47(4):554–566.
- [36] Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 1996 Aug;23(2):277–282.
- [37] Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr;104(15):6442–6447.
- [38] Webster JP, Lambertson PHL, Donnelly CA, Torrey EF. Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer

and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc Biol Sci.* 2006 Apr;273(1589):1023–1030.

[39] Flegr J. Effects of toxoplasma on human behavior. *Schizophr Bull.* 2007 May;33(3):757–760.

[40] Kar N, Misra B. *Toxoplasma* seropositivity and depression: a case report. *BMC Psychiatry.* 2004 Feb;4:1.

[41] El-Sahn AA, Shatat HZ, Ghitany EM. Seropositivity of toxoplasmosis in patients with schizophrenia. *J Egypt Public Health Assoc.* 2005;80(5-6):509–524.

[42] Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1994 Sep;153(6):2533–2543.

[43] Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 2004;40(1):71–80.

[44] Schlüter D, Löhler J, Deckert M, Hof H, Schwendemann G. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. *J Neuroimmunol.* 1991 Mar;31(3):185–198.

[45] Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1992 Jul;149(1):175–180.

[46] Suzuki Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.* 2002 Feb;185 Suppl 1:58–65.

[47] Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol.* 2005 Feb;5(2):162–170.

[48] Suzuki Y, Claflin J, Wang X, Lengi A, Kikuchi T. Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2005 Jan;35(1):83–90.

[49] Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Hadding U. Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. *Eur J Immunol.* 1997 Jun;27(6):1539–1548.

[50] Deckert-Schlüter M, Schlüter D, Hof H, Wiestler OD, Lassmann H. Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine *Toxoplasma* encephalitis: a light microscopic and

ultrastructural immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994 Sep;53(5):457–468.

[51] Jun CD, Kim SH, Soh CT, Kang SS, Chung HT. Nitric oxide mediates the toxoplasmatatic activity of murine microglial cells in vitro. *Immunol Invest.* 1993 Dec;22(8):487–501.

[52] Aline F, Bout D, Dimier-Poisson I. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infect Immun.* 2002 May;70(5):2368–2374.

[53] Peterson PK, Gekker G, Hu S, Chao CC. Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Infect Dis.* 1995 Feb;171(2):516–518.

[54] Oberdörfer C, Adams O, MacKenzie CR, Groot CJAD, Däubener W. Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes. *Adv Exp Med Biol.* 2003;527:15–26.

[55] Melzer T, Duffy A, Weiss LM, Halonen SK. The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for toxoplasma vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infect Immun.* 2008 Nov;76(11):4883–4894.

[56] Däubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim KS, et al. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2001 Oct;69(10):6527–6531.

[57] Strack A, Schlüter D, Asensio VC, Campbell IL, Deckert M. Regulation of the kinetics of intracerebral chemokine gene expression in murine *Toxoplasma* encephalitis: impact of host genetic factors. *Glia.* 2002 Dec;40(3):372–377.

[58] Weiss JM, Downie SA, Lyman WD, Berman JW. Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier. *J Immunol.* 1998 Dec;161(12):6896–6903.

[59] Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 2004 Sep;45(4):545–552.

[60] Abbott N. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002 May;200(5):527.

[61] Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005 Jun;57(2):173–185.

- [62] Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2007 Sep;27(6):687–694.
- [63] Ehrlich P. Vom Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Hirschwald Verlag, Berlin. 1885;.
- [64] Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jan;7(1):41–53.
- [65] Ge S, Song L, Pachter JS. Where is the blood-brain barrier ... really? *J Neurosci Res*. 2005 Feb;79(4):421–427.
- [66] Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:11–28.
- [67] de Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:323–355.
- [68] Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*. 2007 Jan;12(1-2):54–61.
- [69] Segal MB. The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cell Mol Neurobiol*. 2000 Apr;20(2):183–196.
- [70] Strazielle N, Gherzi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000 Jul;59(7):561–574.
- [71] Marchesi VT. The site of leucocyte emigration during inflammation. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 1961 Apr;46:115–118.
- [72] Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today*. 1995 Sep;16(9):449–457.
- [73] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):678–689.
- [74] Muller WA. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest*. 2002 May;82(5):521–533.
- [75] Rahman A, Fazal F. Hug Tightly and Say Goodbye: Role of Endothelial ICAM-1 in Leukocyte Transmigration. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Sep;.
- [76] Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996 Nov;88(9):3259–3287.

- [77] Ley K, Bullard DC, Arbonés ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, et al. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med*. 1995 Feb;181(2):669–675.
- [78] Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 May;26(5):1002–1007.
- [79] Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 1989 Mar;243(4895):1160–1165.
- [80] Ivetic A, Ridley AJ. The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans*. 2004 Dec;32(Pt 6):1118–1121.
- [81] Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:827–872.
- [82] Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*. 2006 Nov;203(12):2569–2575.
- [83] Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*. 1998 Mar;187(6):903–915.
- [84] Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem*. 2001 Apr;49(4):419–432.
- [85] Millán J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol*. 2006 Feb;8(2):113–123.
- [86] Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):784–797.
- [87] Carman CV, Springer TA. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Oct;20(5):533–540.
- [88] Gong Y, Hart E, Shchurin A, Hoover-Plow J. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest*. 2008 Sep;118(9):3012–3024.

- [89] Wang S, Dangerfield JP, Young RE, Nourshargh S. PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *J Cell Sci.* 2005 May;118(Pt 9):2067–2076.
- [90] Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):12–18.
- [91] Kleine TO, Benes L. Immune surveillance of the human central nervous system (CNS): different migration pathways of immune cells through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in healthy persons. *Cytometry A.* 2006 Mar;69(3):147–151.
- [92] Hickey WF. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia.* 2001 Nov;36(2):118–124.
- [93] Kalaria RN. Cerebral endothelial activation and signal transduction mechanisms during inflammation and infectious disease. *Am J Pathol.* 1999 May;154(5):1311–1314.
- [94] Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004 Nov;46(3):261–281.
- [95] Agrawal SM, Yong VW. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 2007;79:99–126.
- [96] Getts DR, Terry RL, Getts MT, Müller M, Rana S, Shrestha B, et al. Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med.* 2008 Sep;205(10):2319–2337.
- [97] Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 2007 Dec;10(12):1544–1553.
- [98] Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007 Oct;179(8):5228–5237.
- [99] Fischer HG, Reichmann G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol.* 2001 Feb;166(4):2717–2726.
- [100] Kim KS. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Aug;6(8):625–634.

- [101] Kim KS. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. *J Infect Dis.* 2002 Dec;186 Suppl 2:220–224.
- [102] Tzeng YL, Stephens DS. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect.* 2000 May;2(6):687–700.
- [103] Drevets DA, Jelinek TA, Freitag NE. *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. *Infect Immun.* 2001 Mar;69(3):1344–1350.
- [104] Talati NJ, Roupheal N, Kuppalli K, Franco-Paredes C. Spectrum of CNS disease caused by rapidly growing mycobacteria. *Lancet Infect Dis.* 2008 Jun;8(6):390–398.
- [105] Timmermans M, Carr J. Neurosyphilis in the modern era. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004 Dec;75(12):1727–1730.
- [106] Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. The pathogenesis of lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. *Mol Med.* 2008;14(3-4):205–212.
- [107] Kaul M, Zheng J, Okamoto S, Gendelman HE, Lipton SA. HIV-1 infection and AIDS: consequences for the central nervous system. *Cell Death Differ.* 2005 Aug;12 Suppl 1:878–892.
- [108] Kaiser R. Tick-borne encephalitis. *Infect Dis Clin North Am.* 2008 Sep;22(3):561–75.
- [109] Nishimura K, Hung T. Current views on geographic distribution and modes of infection of neurohelminthic diseases. *J Neurol Sci.* 1997 Jan;145(1):5–14.
- [110] Ferrari TCA, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R. Immune response and pathogenesis of neuroschistosomiasis *mansoni*. *Acta Trop.* 2008;108(2-3):83–88.
- [111] Pittella JE. Neurocysticercosis. *Brain Pathol.* 1997 Jan;7(1):681–693.
- [112] Taratuto AL, Venturiello SM. Echinococcosis. *Brain Pathol.* 1997 Jan;7(1):673–679.
- [113] Liao CW, Cho WL, Kao TC, Su KE, Lin YH, Fan CK. Blood-brain barrier impairment with enhanced SP, NK-1R, GFAP and claudin-5 expressions in experimental cerebral toxocariasis. *Parasite Immunol.* 2008 Oct;30(10):525–534.
- [114] Taratuto AL, Venturiello SM. Trichinosis. *Brain Pathol.* 1997 Jan;7(1):663–672.
- [115] Grab DJ, Kennedy PGE. Traversal of human and animal trypanosomes across the blood-brain barrier. *J Neurovirol.* 2008 Oct;14(5):344–351.
- [116] Siddiqui R, Khan NA. Balamuthia amoebic encephalitis: an emerging disease with fatal consequences. *Microb Pathog.* 2008 Feb;44(2):89–97.

- [117] Solaymani-Mohammadi S, Lam MM, Zunt JR, Petri WA. Entamoeba histolytica encephalitis diagnosed by PCR of cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Mar;101(3):311–313.
- [118] Chimelli L, Mahler-Araujo MB. Fungal infections. *Brain Pathol.* 1997 Jan;7(1):613–627.
- [119] Jong AY, Stins MF, Huang SH, Chen SH, Kim KS. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. *Infect Immun.* 2001 Jul;69(7):4536–4544.
- [120] Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):4985–4995.
- [121] Grab DJ, Nikolskaia O, Kim YV, Lonsdale-Eccles JD, Ito S, Hara T, et al. African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Parasitol.* 2004 Oct;90(5):970–979.
- [122] Grab DJ, Perides G, Dumler JS, Kim KJ, Park J, Kim YV, et al. *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. *Infect Immun.* 2005 Feb;73(2):1014–1022.
- [123] Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest.* 1998 Jul;102(2):347–360.
- [124] Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, Weiglein I, Bubert A, Engelbrecht F, et al. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. *Infect Immun.* 1998 Nov;66(11):5260–5267.
- [125] Drevets DA, Dillon MJ, Schawang JS, Rooijen NV, Ehrchen J, Sunderkötter C, et al. The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol.* 2004 Apr;172(7):4418–4424.
- [126] Join-Lambert OF, Ezine S, Monnier AL, Jaubert F, Okabe M, Berche P, et al. *Listeria monocytogenes*-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. *Cell Microbiol.* 2005 Feb;7(2):167–180.
- [127] Kanmogne GD, Schall K, Leibhart J, Knipe B, Gendelman HE, Persidsky Y. HIV-1 gp120 compromises blood-brain barrier integrity and enhances monocyte migration across blood-brain barrier: implication for viral neuropathogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Jan;27(1):123–134.

- [128] Tardieux I, Ménard R. Migration of Apicomplexa across biological barriers: the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides. *Traffic*. 2008 May;9(5):627–635.
- [129] Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr Bull*. 2007 May;33(3):745–751.
- [130] Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâtel D, Tardieux I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*. 2006 Jan;107(1):309–316.
- [131] Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol*. 2004 Oct;14(10):528–532.
- [132] Soldati D, Meissner M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Feb;16(1):32–40.
- [133] Barragan A, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med*. 2002 Jun;195(12):1625–1633.
- [134] Lambert H, Vutova PP, Adams WC, Loré K, Barragan A. The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infect Immun*. 2009 Apr;77(4):1679–1688.
- [135] Dellacasa-Lindberg I, Hitziger N, Barragan A. Localized recrudescence of *Toxoplasma* infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Microbes Infect*. 2007 Sep;9(11):1291–1298.
- [136] Veszelka S, Pásztoi M, Farkas AE, Krizbai I, Ngo TKD, Niwa M, et al. Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem Int*. 2007 Jan;50(1):219–228.
- [137] Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem*. 2005 Apr;93(2):279–289.
- [138] Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*. 2005 Feb;25(1):59–127.
- [139] Montesano R, Pepper MS, Möhle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell*. 1990 Aug;62(3):435–445.

- [140] Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2003 Jun;68(6):2150–2156.
- [141] Ford TC, Rickwood D. A new one-step method for the isolation of human mononuclear cells. *J Immunol Methods.* 1990 Dec;134(2):237–241.
- [142] Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis.* 2003 May;3:7.
- [143] Clahsen T, Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc Biol.* 2008 Dec;84(6):1521–1529.
- [144] Barragan A, Brossier F, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol.* 2005 Apr;7(4):561–568.
- [145] Teles RM, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonça-Lima L, Ferreira H, et al. High Matrix Metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun.* 2009 Dec;.
- [146] Yang B, Akhter S, Chaudhuri A, Kanmogne GD. HIV-1 gp120 induces cytokine expression, leukocyte adhesion, and transmigration across the blood-brain barrier: modulatory effects of STAT1 signaling. *Microvasc Res.* 2009 Mar;77(2):212–219.
- [147] Khandoga AG, Khandoga A, Anders HJ, Krombach F. Postischemic vascular permeability requires both TLR-2 and TLR-4, but only TLR-2 mediates the transendothelial migration of leukocytes. *Shock.* 2009 Jun;31(6):592–598.
- [148] Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol.* 2002 Jul;128(1-2):58–68.
- [149] Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol.* 1989 Sep;143(6):2045–2050.
- [150] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163–189.
- [151] Calabria AR, Weidenfeller C, Jones AR, de Vries HE, Shusta EV. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier

properties in response to glucocorticoid induction. *J Neurochem.* 2006 May;97(4):922–933.

[152] Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1985 Jun;8(4-6):203–214.

[153] Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000 Oct;25(9-10):1439–1451.

[154] Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Feb;58(2):138–152.

[155] Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol.* 2006 Oct;8(10):1611–1623.

[156] Carmen JC, Hardi L, Sinai AP. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell Microbiol.* 2006 Feb;8(2):301–315.

[157] Taubert A, Krüll M, Zahner H, Hermosilla C. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006 Aug;112(3-4):272–283.

[158] Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI, Fujimoto Y, Oshel P, et al. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity.* 2003 Nov;19(5):713–724.

[159] Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *J Neuroimmunol.* 2007 Mar;184(1-2):136–148.

[160] Omari KM, Dorovini-Zis K. CD40 expressed by human brain endothelial cells regulates CD4+ T cell adhesion to endothelium. *J Neuroimmunol.* 2003 Jan;134(1-2):166–178.

[161] Debierre-Grockiego F, Azzouz N, Schmidt J, Dubremetz JF, Geyer H, Geyer R, et al. Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of

tumor necrosis factor-alpha production in macrophages. *J Biol Chem.* 2003 Aug;278(35):32987–32993.

[162] Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2007 Jul;179(2):1129–1137.

[163] Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 1990 Aug;4(11):2860–2867.

[164] Suzuki Y, Rani S, Liesenfeld O, Kojima T, Lim S, Nguyen TA, et al. Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun.* 1997 Jun;65(6):2339–2345.

[165] Stein JV, Nombela-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology.* 2005 Sep;116(1):1–12.

[166] Stefanidakis M, Newton G, Lee WY, Parkos CA, Luscinskas FW. Endothelial CD47 interaction with SIRPgamma is required for human T-cell transendothelial migration under shear flow conditions in vitro. *Blood.* 2008 Aug;112(4):1280–1289.

[167] Angelow S, Ahlstrom R, Yu ASL. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Oct;295(4):867–876.

[168] Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007 Nov;127(11):2525–2532.

[169] Johnson-Léger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, Imhof BA. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood.* 2002 Oct;100(7):2479–2486.

[170] Cai G, Radzanowski T, Villegas EN, Kastelein R, Hunter CA. Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2000 Sep;165(5):2619–2627.

[171] Dalpke A, Heeg K, Bartz H, Baetz A. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):225–235.

[172] Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, Dalpke AH. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J Immunol.* 2006 Feb;176(3):1840–1847.

- [173] Dalpke AH, Opper S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol.* 2001 Jun;166(12):7082–7089.
- [174] Franzoso G, Carlson L, Scharon-Kersten T, Shores EW, Epstein S, Grinberg A, et al. Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity.* 1997 Apr;6(4):479–490.
- [175] Taubert A, Zahner H, Hermosilla C. Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet Parasitol.* 2006 Dec;142(3-4):214–222.
- [176] Nagineni CN, Detrick B, Hooks JJ. *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun.* 2000 Jan;68(1):407–410.
- [177] Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol.* 2006 Dec;6(12):895–906.
- [178] Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science.* 2005 Jun;308(5728):1626–1629.
- [179] Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol.* 2004 Mar;172(6):3686–3694.
- [180] Saeij JPJ, Collier S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature.* 2007 Jan;445(7125):324–327.
- [181] Panula P, Joó F, Rechartd L. Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. *Experientia.* 1978 Jan;34(1):95–97.
- [182] Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielsen JL, Ivanov A, Atsumi R, Engman H, et al. Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci.* 2001 Jan;12(3):215–222.

- [183] Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol.* 2005 Feb;25(1):25–39.
- [184] Demeuse P, Kerkhofs A, Struys-Ponsar C, Knoop B, Remacle C, van den Bosch de Aguilar P. Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes: a syngenic model to study the blood-brain barrier. *J Neurosci Methods.* 2002 Nov;121(1):21–31.
- [185] Perrière N, Yousif S, Cazaubon S, Chaverot N, Bourasset F, Cisternino S, et al. A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res.* 2007 May;1150:1–13.
- [186] Santaguida S, Janigro D, Hossain M, Oby E, Rapp E, Cucullo L. Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier in vitro: a permeability study. *Brain Res.* 2006 Sep;1109(1):1–13.
- [187] Weidenfeller C, Schrot S, Zozulya A, Galla HJ. Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res.* 2005 Aug;1053(1-2):162–174.
- [188] Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, et al. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci.* 1994 May;107 (Pt 5):1347–1357.
- [189] Zhang Y, Li CSW, Ye Y, Johnson K, Poe J, Johnson S, et al. Porcine brain microvessel endothelial cells as an in vitro model to predict in vivo blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos.* 2006 Nov;34(11):1935–1943.
- [190] Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, et al. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1997 Jul;110 (Pt 14):1603–1613.
- [191] Anderson JM, Itallie CMV. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol.* 1995 Oct;269(4 Pt 1):467–475.
- [192] Song L, Pachter JS. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 2004 Jan;67(1):78–89.
- [193] Bout D, Moretto M, Dimier-Poisson I, Gatel DB. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. *Immunobiology.* 1999 Dec;201(2):225–228.

- [194] Masocha W, Rottenberg ME, Kristensson K. Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier. *Physiol Behav.* 2007 Sep;92(1-2):110–114.
- [195] Alsam S, Kim KS, Stins M, Rivas AO, Sissons J, Khan NA. Acanthamoeba interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog.* 2003 Dec;35(6):235–241.
- [196] Nottet HS, Persidsky Y, Sasseville VG, Nukuna AN, Bock P, Zhai QH, et al. Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain. *J Immunol.* 1996 Feb;156(3):1284–1295.
- [197] Persidsky Y, Stins M, Way D, Witte MH, Weinand M, Kim KS, et al. A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J Immunol.* 1997 Apr;158(7):3499–3510.
- [198] Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon TM, Berman JW. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J Neurosci.* 2006 Jan;26(4):1098–1106.
- [199] Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009 Jan;77(1):120–127.
- [200] Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Berche P, Milon G, Geissmann F, et al. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol.* 2001 May;3(5):331–340.
- [201] Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, et al. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol.* 2002 Feb;168(3):1362–1371.
- [202] Channon JY, Seguin RM, Kasper LH. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infect Immun.* 2000 Aug;68(8):4822–4826.
- [203] Bierly AL, Shufesky WJ, Sukhumavasi W, Morelli AE, Denkers EY. Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 2008 Dec;181(12):8485–8491.

- [204] Gama LMD, Ribeiro-Gomes FL, Guimarães U, Arnholdt ACV. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 2004 Nov;6(14):1287–1296.
- [205] Unno A, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Kitoh K, Takashima Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int.* 2008 Dec;57(4):515–518.
- [206] Kaneko Y, Takashima Y, Xuaun X, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T, et al. Natural IgM antibodies in sera from various animals but not the cat kill *Toxoplasma gondii* by activating the classical complement pathway. *Parasitology.* 2004 Feb;128(Pt 2):123–129.
- [207] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953–964.
- [208] Nakano H, Lin KL, Yanagita M, Charbonneau C, Cook DN, Kakiuchi T, et al. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol.* 2009 Apr;10(4):394–402.
- [209] Stoneman V, Braganza D, Figg N, Mercer J, Lang R, Goddard M, et al. Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ Res.* 2007 Mar;100(6):884–893.
- [210] Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano GI, los Santos KD, Sparwasser T, et al. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* 2002 Aug;17(2):211–220.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungszyklus von <i>T. gondii</i>	10
Abbildung 2: Infektiöse Formen von <i>T. gondii</i>	12
Abbildung 3: Querschnitt durch die BHS	16
Abbildung 4: Darstellung verschiedener Barrieren des Gehirns.....	17
Abbildung 5: Transendotheliale Migration	19
Abbildung 6: Zellschichtung einer Mikrokapillarpräparation nach Zentrifugation über den Percollgradienten.....	32
Abbildung 7: In-vitro-Kokulturmodell der Blut-Hirn-Schranke	34
Abbildung 8: PBMC-Isolierung aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation	41
Abbildung 9: Ergebnisse der Transkriptomanalysen.....	52
Abbildung 10: ICAM-1-Expression von (A) murinen Endothelzellen (bEnd.3) und (B) primären Rattenendothelzellen (pRBECs).....	55
Abbildung 11: Kinetik der <i>T. gondii</i> -Infektion einer murinen Hirnendothelzelllinie.....	59
Abbildung 12: Mikroskopischer Nachweis zellspezifischer Charakteristika und Marker bei primären Zellen	61
Abbildung 13: Funktionelle Validierung des in-vitro-Modells der Blut-Hirn-Schranke	63
Abbildung 14: Migration naiver Ratten-PBMCs über das Kokulturmodell der Blut-Hirn- Schranke nach TNF α -Stimulation	65
Abbildung 15: Migration infizierter Ratten-PBMCs durch die BHS	68
Abbildung 16: Migration von Mauszellen durch die BHS in-vitro in Abhängigkeit von einem MCP-1-Gradienten	69
Abbildung 17: Anteil infizierter Zellen an Zellsubpopulationen nach Migration infizierter Maus-PBMCs durch die BHS in-vitro	71
Abbildung 18: Anteil von Zellsubpopulationen nach Migration infizierter Maus-PBMCs durch die BHS in-vitro verwendet.....	73
Abbildung 19: Durchflusszytometrischer Nachweis mononukleärer Zellen im Gehirn von Mäusen, die mit 10 ⁷ Tachyzoiten intravenös infiziert worden waren.....	74
Abbildung 20: Intrazellulärer Transport von <i>T. gondii</i> in das Gehirn.....	76

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zerebral-pathogene Mikroorganismen	21
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien.....	25
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial.....	26
Tabelle 4: Verwendete Puffer	27
Tabelle 5: Verwendete Primer und Sonden	28
Tabelle 6: Verwendete Antikörper	28
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	29
Tabelle 8: Verwendete Software.....	29
Tabelle 9: Externe Dienstleistungen	29
Tabelle 10: Verwendete Tierstämme.....	29
Tabelle 11: Verwendete Zelllinien.....	30
Tabelle 12: „Mastermix“ für qLC-PCR.....	45
Tabelle 13: Antikörper zur Charakterisierung primärer Zellen durch Immunfluoreszenz-Färbung.....	48

8.3 Publikationen, Kongressbeiträge/-teilnahmen, Weiterbildungen und Kooperationen

8.3.1 Publikationen

Candela M, Seibold G, Vitali B, **Lachenmaier S**, Eikmanns BJ, Brigidi P.

Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens. Res Microbiol. 2005 Sep;156(8):887-95

Shubar HM, Dunay IR, **Lachenmaier S**, Dathe M, Bushrab FN, Mauludin R, Müller RH, Fitzner R, Borner K, Liesenfeld O.

The role of apolipoprotein E in uptake of atovaquone into the brain in murine acute and reactivated toxoplasmosis. J Drug Target. 2009 Mar 2:1-11

Shubar HM, **Lachenmaier S**, Heimesaat MM, Lohman U, Mauludin R, Mueller RH, Fitzner R, Borner K, Liesenfeld O.

Oral therapy with SDS-coated atovaquone nanosuspensions shows improved efficacy against acute and reactivated murine toxoplasmosis.

In Bearbeitung

Lachenmaier S, Deli MA, Liesenfeld O.

In-vitro and in-vivo-investigations on *Toxoplasma gondii* neuroinvasion.

In Bearbeitung

8.3.2 Kongressbeiträge

Vortrag:

„In-vitro model of the blood-brain barrier to study the entry of *Toxoplasma gondii* into the brain“. Symposium „Infection and Immunity“ der FG Infektionsimmunologie der DGHM/AK Infektionsimmunologie der DGfI in Rothenfels (2007).

Poster

„In-vitro model of the blood-brain barrier to study the entry of *Toxoplasma gondii* into the brain“. 10. Symposium "Signal transduction in the blood-brain barriers", Potsdam (2007).

8.3.3 Kongressteilnahmen

- 7. Expertentreffen „Blut-Hirn-Schranke“, Bad Herrenalb (2005)
- 6th Conference on Cerebral Vascular Biology together with the 8th International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Münster (2005)
- 8. Expertentreffen „Blut-Hirn-Schranke“, Bad Herrenalb (2006)
- 2nd NYU/ZIBI Symposium on Host Pathogen Interactions, Berlin (2006)
- Symposium „Targets, Drugs and Carriers“, Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin (FG 463) (2007)

8.3.4 Weiterbildungen

- 4th International Workshop Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Berlin (2005)
- Symposium zur Qualitätssicherung im medizinischen Laboratorium. Bedeutung und aktuelle Probleme. Institut für Infektionsmedizin, Abteilung Virologie der Charité, Berlin (2005)
- Erfolgreiche Teilnahme am Seminar und Praktikum “Versuchstiere, Tierversuche und Alternativmethoden” im Wintersemester 05/06, veranstaltet von der Humboldt Universität zu Berlin, Freie Universität Berlin, zebet / BgVV
- Einwöchiger Laboraufenthalt im “Biological Research Center” in Szeged, Ungarn. Erlernen spezifischer Zellkulturtechniken zur Arbeit mit dem in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke (2006)
- EMBO Practical Course on Cytometry and Cell Sorting for Functional Genomics and Proteomics, DRFZ, Berlin (2006)
- Infektionsimmunologie-Kurs des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene, Charité Berlin (2006)
- 3rd Spring School on Immunology, Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Ettal (2007)

8.3.5 Kooperationsprojekte

Kooperation mit Dr. M. Deli vom Biological Research Center in Szeged, Ungarn, zur Nutzung des Blut-Hirn-Schranke-Modells für transendotheliale Zellmigrationsstudien.

Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Multhaupt, Biochemie der FU Berlin, zur Passage von Kupfer-Carriern durch ein in-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke.

Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. H. Bäumlner, Transfusionsmedizin der Charité, zur Passage von Antimykotika durch die Blut-Hirn-Schranke mittels beladener Erythrozyten.

Kooperation mit Dr. J. Dervede, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité, zur Testung dendritischer Polyglycerolsulfate als Selektininhibitoren.

Kooperation mit Dr. F. Debierre-Grockiego, Parasitologie der Philipps-Universität Marburg, zur Testung von *T. gondii*-GPI-Ankern bezüglich der Aktivierung von primären Hirnkapillarendothelzellen und Endothelzelllinien.

Danksagung

Prof. Dr. Oliver Liesenfeld danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation in seinem Labor und unter seiner Betreuung durchführen zu können.

Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und für das Vertreten meiner Arbeit vor dem Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Forschergruppe 463) und die Sonnenfeld-Stiftung haben mich während meiner Promotion finanziell gefördert. Mein Dank geht vor allem an Prof. Dr. Dr. von Villiez, der in einer familiären Atmosphäre für Probleme „seiner“ Doktoranden immer ein offenes Ohr hatte und sich stets für uns eingesetzt hat.

Dr. Mária Deli und Dr. Szilvia Veszelka vom Biological Research Center in Szeged danke ich für die Zeit, die sie investiert haben, um mir das nötige Wissen über das Blut-Hirn-Schranken-Modell zu vermitteln.

Dank der unkomplizierten Hilfe von Priv. Doz. Dr. Salah Amasheh, Prof. Dr. Heinz Zeichardt, Frau Hennig und Susanne Fehse war es mir möglich, die fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen anzufertigen.

Für die stete Hilfe durch die Tierpfleger Thomas Strandt, Elfriede Decher, Gaby Dambon und Dominique Heine möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Berit Söhl-Kielczynski danke ich für ihre immerwährende technische und menschliche Unterstützung, welche meine Arbeit sehr bereichert haben.

Bei allen Doktoranden möchte ich mich für die täglichen „interkulturellen“ Diskussionen und Einsichten bedanken, allen voran natürlich Hend Shubar, Lara Bajohr, Anna Gomes, Susanne Matschi, Agata Dukaczewska, Melba Munoz und Pinar Önal. Ohne Euch wäre die Zeit im Labor niemals so lustig gewesen und ich hätte mich sonst als „non-native german speaker“ sehr einsam gefühlt. Aber auch die anderen Mitglieder unserer Arbeitsgruppe haben mit Tipps, Tricks und guter Laune zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt all den Ratten und Mäusen, die mir – im wahrsten Sinne des Wortes – unter Einsatz ihres Lebens dabei geholfen haben, diese Doktorarbeit anzufertigen.

Für mich persönlich war während der Promotion ein Mensch am wichtigsten. Ich bin sehr dankbar, dass mein Mann mir zu jeder Zeit den notwendigen Rückhalt, die Ruhe und die Sicherheit gegeben hat, die ich für diese Doktorarbeit brauchte und mich immer wieder zum Durchhalten angespornt hat. Und dafür hätte ich viel öfter DANKE sagen müssen!

Mein Dank gilt aber auch meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt haben. Das Allgäu war immer ein wichtiges Refugium, wenn der Stress mal zu viel wurde. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Berlin, den 03.02.2010

Sabrina Maria Lachenmaier