

Dipl.-Biol. Ulrike Händel:

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

Zusammenfassung

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) ist ein weltweit verbreiteter, obligat intrazellulärer Parasit, welcher in immunkompetenten Menschen eine weitgehend symptomlose Infektion des Zentralnervensystems (ZNS) verursacht, dort unter anderem Astrozyten und Neuronen infiziert und im letzteren Zelltyp persistiert. Der immunologische Schutz wird bei der *Toxoplasma* Enzephalitis (TE) ganz wesentlich von Interferon (IFN)- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vermittelt. Jedoch tragen auch weitere hirnsässige Zellen wie Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen und weitere Zytokine wie einzelne der Interleukin (IL)-6 Familie (IL-6 und IL-27) zur Erregerabwehr und zum intrazerebralen Entzündungsgeschehen bei. Um einen vertieften Einblick in die Funktion von Astrozyten und Neuronen bei der TE zu erlangen, wurden Mäuse generiert, bei denen selektiv entweder Neuronen oder Astrozyten keine Oberflächenexpression von gp130, der gemeinsamen Rezeptoruntereinheit aller Rezeptoren für die IL-6 Zytokinfamilie, aufwiesen.

Die gp130-Deletion auf Neuronen führte in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen zu einer signifikant erhöhten Mortalität, einem starken Neuronenverlust innerhalb und außerhalb entzündlicher Areale, einer signifikant erhöhten intrazerebralen Parasitenlast und einer gesteigerten Rekrutierung inflammatorischer Leukozyten, wie IFN- γ ⁺, IL-17⁺ und regulatorischer T-Zellen. Anti-inflammatorische Zytokine wie *Transforming Growth Factor* (TGF)- β und IL-27, welches die IL-17-Synthese in T-Zellen und die damit verbundene Immunpathologie reduzieren kann, waren hingegen vermindert. *In vitro*-Experimente zeigten, dass Neuronen nach IL-6-Stimulation gp130-abhängig TGF- β und IL-27 produzierten. In weiterführenden Zellkulturexperimenten konnte eine erhöhte Apoptose in *T. gondii* infizierten gp130-defizienten Neuronen nachgewiesen werden. Die *in vitro*-Stimulation mit Zytokinen der IL-6 Familie senkte die Apoptoserate in gp130-exprimierenden Neuronen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Invasion und Replikation der Parasiten in Neuronen.

Bei der TE in gp130^{fl/fl} Kontrollmäusen bildete sich eine Astrogliose in entzündeten, infizierten Bereichen aus. Diese Astrozytenaktivierung und -vermehrung führte dazu, dass Astrozyten einen Wall um diese entzündeten Bereiche bildeten und so eine Ausbreitung von *T. gondii* und eine Vergrößerung der entzündlichen Areale verhinderten. Wurden jedoch Mäuse mit fehlender gp130-Expression auf der Zelloberfläche von Astrozyten (hGFAP-Cre gp130^{fl/fl}) mit *T. gondii* infiziert, trat ein massiver Verlust von Astrozyten innerhalb der Entzündungsareale ein. Die verbleibende geringe Zahl von Astrozyten war nicht in der Lage, die Entzündungsherde lokal zu begrenzen, so dass sich eine nekrotisierende TE mit einer erhöhten Zahl intrazerebraler Parasiten entwickelte. In hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} Mäusen waren die intrazerebrale IFN- γ Produktion erhöht, die IL-27-Synthese vermindert und die Regulation von MCP-1 und CXCL-10 im Krankheitsverlauf verändert. *In vitro*-Infektionen gp130-defizienter Astrozyten zeigten eine erhöhte Apoptose, jedoch keine Veränderung hinsichtlich der Invasion in die Wirtszellen.

Die erstmalige Verwendung von astrozyten- und neuronenspezifischen konditionalen Knockout-Mäusen im Modell der murinen TE zeigte, dass 1) Astrozyten und Neuronen essentielle protektive Funktionen ausüben, 2) die Expression der für die rezeptorvermittelte Funktion der Zytokine der IL-6 Familie essentiellen Rezeptoruntereinheit gp130 auf der Zelloberfläche von Astrozyten und Neuronen entscheidend für die protektive Funktion dieser Zellen ist und 3) gp130 bei der TE ein wichtiger Überlebensfaktor für Astrozyten und Neuronen ist.

Dipl.-Biol. Ulrike Händel:

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

Abstract

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) is a worldwide distributed, obligate intracellular parasite, which causes a clinical asymptomatic infection of the central nervous system (CNS) in immunocompetent humans. In the CNS, *T. gondii* infect astrocytes and neurons and persist in the latter cell type. In *Toxoplasma* encephalitis (TE) interferon (IFN)- γ producing CD4⁺ and CD8⁺ T-cells are the major protective cell populations. In addition, brain resident cells including astrocytes, neurons and microglia as well as other cytokines, in particular cytokines of the interleukin (IL)-6 family (IL-6 and IL-27), contribute to control of *T. gondii* and the intracerebral immune response. To gain more insight into the function of astrocytes and neurons in TE, mice with a conditional deletion of cell surface expression of gp130, the common signal transducing receptor subunit of all cytokines of the IL-6 family, in astrocytes (hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} mice) and neurons (Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} mice) were generated.

Neuronal deletion of gp130 in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} mice caused an increased mortality, a substantial loss of neurons inside and outside of inflammatory lesions, a significantly increased intracerebral parasitic load and an elevated recruitment of inflammatory leukocytes as compared to gp130^{fl/fl} control mice. In addition, the intracerebral cytokine response was dysregulated in Synapsin-Cre gp130^{fl/fl} mice: the numbers of IFN- γ ⁺, IL-17⁺ and regulatory T cells were significantly increased. In contrast, the expression of the anti-inflammatory cytokines IL-27, which can reduce IL-17-induced immunopathology, and Transforming Growth Factor (TGF)- β were diminished. *In vitro* experiments identified neurons as a source of TGF- β and IL-27, which were induced upon IL-6 stimulation but not after infection with *T. gondii*. Further *in vitro* experiments revealed an enhanced apoptosis of *T. gondii*-infected gp130-deficient neurons. Stimulation of gp130 expressing neurons with cytokines of the IL-6 family reduced apoptosis, but did not influence invasion and replication of *T. gondii* in neurons.

Astrogliosis was a hallmark of TE in gp130^{fl/fl} control mice. Proliferating and activated astrocytes intimately surrounded inflammatory lesions and prevented further spread of the parasite and enlargement of inflammatory lesions. Infection of hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} mice resulted in a substantial loss of astrocytes close to inflammatory lesions. The remaining small numbers of astrocytes were not able to contain the inflammatory lesions leading to a necrotizing TE with a significantly increased intracerebral parasitic load and an increased mortality of hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} mice. Additional *in vitro* experiments revealed an increased apoptosis of gp130-deficient neurons in infected astrocyte cultures. In contrast, invasion of *T. gondii* in astrocytes was not affected by gp130. In hGFAP-Cre gp130^{fl/fl} mice, intracerebral IFN- γ production and IL-27 expression were decreased. In addition, expression of MCP-1 and CXCL-10 was dysregulated during the course of TE, but did not influence the intracerebral recruitment and homing of leukocytes in these mice.

In this thesis, astrocyte- and neuron-specific conditional knockout mice were used for the first time in TE and the results revealed 1) an essential protective function of astrocytes and neurons in TE, 2) that cell surface expression of gp130 was essential for the indispensable protective function of neurons and astrocytes and 3) that gp130 expression on astrocytes and neurons is an important survival factor for astrocytes and neurons in TE.