

**Interaktions- und Sekretionsverhalten des**  
**„Dichte-Granula“ Proteins GRA9**  
**von *Toxoplasma gondii***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katrin H. Spekker

aus Leer

August 2008

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. W. Däubener

Koreferent: Prof. Dr. J. F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt. Sie wurde von der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität sowie dem BMBF Programm „Zoonosen“ unterstützt.

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                  |             |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>                                                  | <b>I</b>    |
| <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>                                                | <b>VI</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis.....</b>                                                  | <b>VIII</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                               | <b>IX</b>   |
| <b>1. Einleitung .....</b>                                                       | <b>1</b>    |
| 1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> -Taxonomie und Bedeutung .....                     | 1           |
| 1.2. Pathogenese.....                                                            | 2           |
| 1.2.1. Postnatale Toxoplasmose .....                                             | 2           |
| 1.2.2. Präinatale Toxoplasmose.....                                              | 3           |
| 1.3. Der Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> .....                         | 4           |
| 1.4. Diagnose der Toxoplasmose .....                                             | 6           |
| 1.5. Therapie der Toxoplasmose .....                                             | 7           |
| 1.6. Einteilung und Virulenz von <i>Toxoplasma gondii</i> .....                  | 8           |
| 1.7. Tachyzoiten und Bradyzoiten .....                                           | 9           |
| 1.8. Invasion von <i>Toxoplasma gondii</i> in die Wirtszelle.....                | 13          |
| 1.9. Asexuelle Vermehrung und Egression aus der Parasitophoren Vakuole.....      | 16          |
| 1.10. Die sekretorischen Organellen von <i>Toxoplasma gondii</i> .....           | 18          |
| 1.10.1. Die Mikronemen .....                                                     | 18          |
| 1.10.2. Die Rhoptrien .....                                                      | 20          |
| 1.10.3. Die Dichten-Granula .....                                                | 20          |
| 1.10.4. GRA-Proteine und ihre Lokalisation .....                                 | 22          |
| 1.11. „Targeting“ von MIC-, ROP- und GRA-Proteinen zu ihren Zielorganellen ..... | 25          |
| 1.12. <i>Toxoplasma gondii</i> : Zytoskelett und Fortbewegung.....               | 27          |
| 1.13. Genetik von <i>Toxoplasma gondii</i> .....                                 | 27          |
| 1.14. <i>Toxoplasma gondii</i> im Labor .....                                    | 29          |
| 1.15. Zielsetzung der Arbeit.....                                                | 30          |
| <b>2. Material .....</b>                                                         | <b>33</b>   |
| 2.1. Allgemeines.....                                                            | 33          |

---

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2. Plasmide .....                                             | 33        |
| 2.3. Desoxyoligonukleotide .....                                | 34        |
| 2.4. Antikörper .....                                           | 35        |
| 2.5. Restriktionsenzyme für die Molekularbiologie.....          | 36        |
| 2.6. Sonstige Enzyme .....                                      | 36        |
| 2.7. Größenstandards.....                                       | 37        |
| 2.7.1. Größenstandards für Nukleinsäuren.....                   | 37        |
| 2.7.2. Größenstandards für Proteine.....                        | 37        |
| 2.8. Medien und Puffer.....                                     | 38        |
| 2.9. Feinchemikalien .....                                      | 39        |
| 2.10. Sonstige Materialien und Geräte.....                      | 41        |
| 2.11. Plastikwaren und sonstige Einwegartikel.....              | 42        |
| 2.12. Molekularbiologische Kits .....                           | 43        |
| 2.13. Antibiotika.....                                          | 43        |
| 2.14. Zelllinien und Bakterienstämme .....                      | 44        |
| 2.14.1. Zelllinien .....                                        | 44        |
| 2.14.2. Bakterienstämme.....                                    | 44        |
| 2.14.3. <i>Toxoplasma gondii</i> -Stämme.....                   | 44        |
| <b>3. Methoden.....</b>                                         | <b>46</b> |
| 3.1. Mikrobiologische Methoden .....                            | 46        |
| 3.1.1. Kultivierung von Bakterien.....                          | 46        |
| 3.1.2. Stammkulturen .....                                      | 46        |
| 3.1.3. Bestimmung der Optischen Dichte .....                    | 46        |
| 3.1.4. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....     | 47        |
| 3.1.5. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....  | 47        |
| 3.2. Molekularbiologische Methoden .....                        | 48        |
| 3.2.1. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....       | 48        |
| 3.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA .....                       | 48        |
| 3.2.1.2. Isolierung von genomischer DNA .....                   | 48        |
| 3.2.1.3. Phenol-Chloroform-Extraktion.....                      | 49        |
| 3.2.1.4. Ethanolfällung von Nukleinsäuren .....                 | 49        |
| 3.2.1.5. Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen..... | 50        |
| 3.2.1.6. Isolierung von Gesamt-RNA .....                        | 50        |

---

|           |                                                                                |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1.7.  | cDNA-Synthese .....                                                            | 51 |
| 3.2.1.8.  | Isolierung von mRNA .....                                                      | 51 |
| 3.2.1.9.  | Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....                | 52 |
| 3.2.2.    | Enzymatische Reaktionen .....                                                  | 52 |
| 3.2.2.1.  | DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....                               | 52 |
| 3.2.2.2.  | Dephosphorylierung von DNA .....                                               | 53 |
| 3.2.2.3.  | Ligation von DNA .....                                                         | 53 |
| 3.2.2.4.  | Polymerase-Ketten-Reaktion .....                                               | 53 |
| 3.2.2.5.  | DNA-Sequenzierung .....                                                        | 54 |
| 3.2.2.6.  | Klonierung von PCR-Produkten .....                                             | 55 |
| 3.3.      | Gelelektrophoretische Analysen .....                                           | 55 |
| 3.3.1.    | Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten .....                        | 55 |
| 3.3.2.    | Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....                   | 56 |
| 3.4.      | Proteinanalytische Methoden .....                                              | 58 |
| 3.4.1.    | Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau .....          | 58 |
| 3.4.2.    | Western-Blot-Analyse .....                                                     | 58 |
| 3.4.3.    | Reversible Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau S .....             | 59 |
| 3.4.4.    | Immunchemischer Nachweis von Proteinen .....                                   | 60 |
| 3.4.5.    | Indirekte Immunfluoreszenzanalyse .....                                        | 60 |
| 3.4.6.    | Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen .....                                 | 61 |
| 3.4.7.    | <i>In vitro</i> -Induktion von „excreted-secreted-antigens“ (ESA) .....        | 62 |
| 3.4.8.    | Herstellung von <i>Toxoplasma gondii</i> -Lysat .....                          | 62 |
| 3.4.9.    | Aufschließen von Zellen durch Ultraschall .....                                | 63 |
| 3.4.10.   | Triton-X-114-Partitionierung .....                                             | 63 |
| 3.4.11.   | Isolierung intrazellulärer Toxoplasmen und Membran-assoziiierter Proteine .... | 64 |
| 3.4.12.   | Zellfraktionierung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....                          | 64 |
| 3.4.13.   | Immunpräzipitation mit immobilisierter Protein-G-Sepharose .....               | 65 |
| 3.4.13.1. | Protein-Protein-Interaktionsuntersuchung in der Parasitophoren Vakuole ....    | 66 |
| 3.5.      | Erzeugung von <i>Toxoplasma gondii</i> -Mutanten .....                         | 66 |
| 3.5.1.    | Überexpression von Proteinen in <i>Toxoplasma gondii</i> .....                 | 66 |
| 3.5.2.    | Transfektion von <i>Toxoplasma gondii</i> .....                                | 67 |
| 3.5.3.    | Isolierung stabiler <i>Toxoplasma gondii</i> -Transfektanten .....             | 68 |
| 3.5.4.    | Klonierung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....                                  | 69 |

---

|           |                                                                                                                                                   |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.5.    | <i>Toxoplasma gondii</i> -Proliferationstest .....                                                                                                | 69        |
| 3.6.      | Sequenzanalyse .....                                                                                                                              | 70        |
| 3.7.      | Zellbiologische Arbeitstechniken.....                                                                                                             | 70        |
| 3.7.1.    | Zellkulturmethoden .....                                                                                                                          | 70        |
| 3.7.2.    | Kultivierung und Einfrieren von Zelllinien.....                                                                                                   | 71        |
| 3.7.3.    | <i>In vitro</i> Kultivierung und Konservierung.....                                                                                               | 72        |
| 3.7.4.    | Einfrieren von <i>Toxoplasma gondii</i> -Tachyzoiten.....                                                                                         | 72        |
| 3.7.5.    | Auftauen von <i>Toxoplasma gondii</i> -Tachyzoiten .....                                                                                          | 73        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                                                                                                                           | <b>74</b> |
| 4.1.      | Charakterisierung von GRA9.....                                                                                                                   | 74        |
| 4.2.      | Funktionsanalyse von charakteristischen Domänen innerhalb der GRA9-Sequenz.....                                                                   | 76        |
| 4.2.1.    | Konstruktion von GRA9-Deletionsmutanten.....                                                                                                      | 77        |
| 4.2.2.    | Expression der GRA9-myc-Deletionsmutanten in <i>Toxoplasma gondii</i> .....                                                                       | 79        |
| 4.2.3.    | Wachstumsbestimmungen von RH-GRA9-myc und RH-GRA9-myc-<br>Deletionsmutanten.....                                                                  | 81        |
| 4.3.      | Nachweis der GRA9-myc-Fusionsproteine in den Dichten-Granula von<br><i>Toxoplasma gondii</i> .....                                                | 83        |
| 4.4.      | Lokalisation des GRA9-myc-Fusionsproteins und der GRA9-myc-<br>Deletionsmutanten in der Parasitophoren Vakuole von <i>Toxoplasma gondii</i> ..... | 86        |
| 4.5.      | Analyse der subzellulären Verteilung der deletierten GRA9-myc-Fusionsproteine.....                                                                | 89        |
| 4.6.      | Detaillierte Analyse der GRA9-Assoziation an membranöse Strukturen innerhalb<br>der Parasitophoren Vakuole .....                                  | 92        |
| 4.7.      | Ansätze zur Identifizierung molekularer GRA9-Interaktionspartner .....                                                                            | 93        |
| 4.7.1.    | Analyse von GRA9 Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der<br>Parasitophoren Vakuole .....                                                      | 93        |
| 4.7.2.    | Analyse von GRA9-Protein-Protein-Interaktionen durch Immun-<br>präzipitation.....                                                                 | 95        |
| 4.8.      | Subzelluläre Lokalisation von GRA9 und GRA1 in einer GRA5-knock-out-<br>Mutante .....                                                             | 98        |
| 4.9.      | Detaillierte Analyse der GRA9- und GRA1-Lokalisation in einer GRA5-knock-<br>out-Mutante durch Zellfraktionierung.....                            | 100       |
| 4.10.     | Charakterisierung essentieller Domänen für die Protein-Protein-Interaktion des<br>GRA9-Proteins.....                                              | 101       |

---

|                                                                                                                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.10.1. Analyse des GRA1- und GRA5-Interaktionsverhalten mit GRA9-myc-Deletionsmutanten.....                                                                                            | 101        |
| 4.11. <i>In vitro</i> -Interaktion von GRA1 und GRA5 mit Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Proteinen.....                                                                                | 103        |
| 4.11.1. Generierung von Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Proteinen .....                                                                                                                | 103        |
| 4.11.2. Stabile Expression von Carboxy-terminal verkürzten GRA9-myc-Fusionsproteinen in RH-Tachyzoiten.....                                                                             | 104        |
| 4.11.3. Einfluss des Carboxy-terminalen Bereichs von GRA9 auf das Protein-Protein-Interaktionsverhalten innerhalb der Parasitophoren Vakuole .....                                      | 105        |
| 4.11.4. Lokalisation der Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Fusionsproteine GRA9 $\Delta$ 202-318-myc- und GRA9 $\Delta$ 253-318-myc in RH-Tachyzoiten von <i>Toxoplasma gondii</i> ..... | 107        |
| <b>5. Diskussion .....</b>                                                                                                                                                              | <b>109</b> |
| 5.1. Charakterisierung von spezifischen Proteindomänen innerhalb der GRA9-Sequenz.                                                                                                      | 110        |
| 5.2. Funktionelle Folgen der Überexpression der GRA9-myc-Fusionsproteine in <i>Toxoplasma gondii</i> Tachyzoiten .....                                                                  | 112        |
| 5.3. Analyse des Lösungsverhaltens von GRA9-myc-Fusionsproteinen innerhalb der Dichten-Granula .....                                                                                    | 113        |
| 5.4. Analyse der subzellulären Verteilung von GRA9-myc-Fusionsproteinen innerhalb der Parasitophoren Vakuole .....                                                                      | 115        |
| 5.5. GRA9 interagiert mit anderen GRA-Proteinen innerhalb der Parasitophoren Vakuole .....                                                                                              | 118        |
| 5.6. „Targeting“ und Lokalisation von GRA9 in Abwesenheit des Interaktionspartners GRA5 .....                                                                                           | 122        |
| 5.7. Redundante Funktion der Interaktionsdomänen oder funktionelle Bedeutung der flankierenden Proteinregionen im GRA9 Molekül? .....                                                   | 124        |
| <b>6. Zusammenfassung .....</b>                                                                                                                                                         | <b>127</b> |
| <b>7. Summary .....</b>                                                                                                                                                                 | <b>128</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                                                                                    | <b>129</b> |
| <b>9. Danksagung.....</b>                                                                                                                                                               | <b>150</b> |



## Abbildungsverzeichnis

|            |                                                                                                                                                                                                                   |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1.1:  | Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> .....                                                                                                                                                                   | 5  |
| Abb. 1.2:  | Das <i>Toxoplasma gondii</i> -Conoid .....                                                                                                                                                                        | 10 |
| Abb. 1.3:  | Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten.....                                                                                                                                                             | 12 |
| Abb. 1.4:  | Invasion des <i>Toxoplasma gondii</i> -Tachyzoiten in die Wirtszelle .....                                                                                                                                        | 14 |
| Abb. 1.5:  | Ausbildung des tubulovesikulären Netzwerks innerhalb der PV.....                                                                                                                                                  | 16 |
| Abb. 1.6:  | Vermehrung der Toxoplasmen durch Endodyogenie .....                                                                                                                                                               | 17 |
| Abb. 1.7:  | Die subzellulären Organellen von <i>Toxoplasma gondii</i> .....                                                                                                                                                   | 19 |
| Abb. 1.8:  | Lokalisation der GRA-Proteine an charakteristischen Zielstrukturen innerhalb<br>der PV .....                                                                                                                      | 23 |
| Abb.1.9:   | Schematische Darstellung charakteristischer GRA-Proteindomänen von<br><i>Toxoplasma gondii</i> .....                                                                                                              | 25 |
| Abb. 1.10: | „Targeting“ der sekretorischen <i>Toxoplasma gondii</i> -Proteine zu ihren<br>Zielorganellen .....                                                                                                                | 26 |
| Abb. 4.1:  | Darstellung der Aminosäuresequenz sowie der charakteristischen Domänen<br>von GRA9 .....                                                                                                                          | 75 |
| Abb. 4.2:  | Phosphorylierungsstellen von GRA9.....                                                                                                                                                                            | 76 |
| Abb. 4.3:  | Schematische Darstellung der deletierten GRA9-myc-Konstrukte .....                                                                                                                                                | 77 |
| Abb. 4.4:  | Konstruktion der Expressionsvektoren pTub-GRA9-myc sowie pTub-<br>GRA9 $\Delta$ AH-myc, pTub-GRA9 $\Delta$ HH1-myc, pTub-GRA9 $\Delta$ HH2-myc und pTub-<br>GRA9 $\Delta$ PEST-myc .....                          | 79 |
| Abb. 4.5:  | Expression von GRA9-myc-, GRA9- $\Delta$ AH-myc-, GRA9- $\Delta$ HH1-myc-, GRA9-<br>$\Delta$ HH2-myc- und GRA9-PEST-myc-Fusionsproteinen in <i>T. gondii</i> RH-<br>Tachyzoiten.....                              | 80 |
| Abb. 4.6:  | Unveränderte <i>in vitro</i> -Proliferation von RH-GRA9-myc-, RH-GRA9 $\Delta$ AH-myc-<br>, RH-GRA9 $\Delta$ HH1-myc-, RH-GRA9 $\Delta$ HH2-myc- und RH-GRA9 $\Delta$ PEST-myc-<br>Toxoplasmen in HFF-Zellen..... | 82 |
| Abb. 4.7:  | Unveränderte Morphologie intrazellulärer GRA9-myc-Mutanten in HFF-Zellen ..                                                                                                                                       | 83 |
| Abb. 4.8:  | Löslichkeit von GRA9-, GRA9-myc-, GRA9 $\Delta$ AH-myc-, GRA9 $\Delta$ HH1-myc-,<br>GRA9 $\Delta$ HH2-myc- und GRA9 $\Delta$ PEST-myc-Proteinen in den Dichten-Granula<br>von <i>T. gondii</i> .....              | 85 |

---

|                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 4.9: Identische Expression von GRA9 und GRA9-myc in RH-Toxoplasmen.....                                                                             | 87  |
| Abb. 4.10: Unverändertes GRA9-Verteilungsmuster in den GRA9 $\Delta$ AH-myc-,<br>GRA9 $\Delta$ HH1-myc- und GRA9 $\Delta$ HH2-myc-Deletionsmutanten..... | 88  |
| Abb. 4.11: Verteilung von GRA9 in RH-GRA9-myc-Mutanten innerhalb der PV .....                                                                            | 90  |
| Abb. 4.12: Lokalisationsnachweis der myc-Fusionsproteine innerhalb der PV .....                                                                          | 91  |
| Abb. 4.13: Stabile GRA9-Membran-Assoziation erfolgt unabhängig von der amphiphilen<br>Alpha-Helix sowie den hydrophoben Sequenzdomänen von GRA9.....     | 92  |
| Abb. 4.14: Co-Lokalisation von GRA9 mit <i>Toxoplasma gondii</i> GRA-Proteinen innerhalb<br>der PV .....                                                 | 94  |
| Abb. 4.15: Interaktion von GRA9 mit dem löslichen Protein GRA1 sowie den PVM-<br>assoziierten Proteinen GRA3 und GRA5.....                               | 96  |
| Abb. 4.16: Bestehende Interaktion zwischen den GRA-Proteinen GRA1, GRA3, GRA5<br>und GRA9 .....                                                          | 97  |
| Abb. 4.17: Immunfluoreszenzanalyse von GRA9 in GRA5-„knock-out“-Mutanten.....                                                                            | 98  |
| Abb. 4.18: Fehlender Einfluss von GRA5 auf das „Targeting“ von GRA1 .....                                                                                | 99  |
| Abb. 4.19: Unveränderte Membran-Assoziation von GRA9 und GRA1 in der GRA5-<br>knock-out-Mutante.....                                                     | 100 |
| Abb. 4.20: Interaktion der GRA9-myc-Deletionsproteine mit GRA1 und GRA5 .....                                                                            | 102 |
| Abb. 4.21: Schematische Darstellung der Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Konstrukte<br>GRA9 $\Delta$ 253-318-myc und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc .....     | 103 |
| Abb. 4.22: Expression der Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Konstrukte in RH-<br>Toxoplasmen.....                                                         | 104 |
| Abb. 4.23: Wachstum von GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Mutanten in<br>HFF-Zellen.....                                          | 105 |
| Abb. 4.24: Co-Immunpräzipitation zur Analyse der Komplexbildung von GRA1 und<br>GRA5 mit Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Proteinen .....                | 106 |
| Abb. 4.25: Verändertes Verteilungsmuster der GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- und GRA9 $\Delta$ 202-<br>318-myc-Proteine in der PV .....                       | 107 |

---

## Tabellenverzeichnis

|               |                                                                      |    |
|---------------|----------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 2.1:  | Verwendete Plasmide.....                                             | 33 |
| Tabelle 2.2:  | Primer zur Klonierung und Mutagenese .....                           | 34 |
| Tabelle 2.3:  | Primäre Antikörper .....                                             | 35 |
| Tabelle 2.4:  | Sekundäre Antikörper .....                                           | 35 |
| Tabelle 2.5:  | Verwendete Restriktionsenzyme .....                                  | 36 |
| Tabelle 2.6:  | Sonstige Enzyme für die Molekularbiologie .....                      | 36 |
| Tabelle 2.7:  | Molekulargewichte der Proteingrößenstandards von SeeBlue Plus2 ..... | 37 |
| Tabelle 2.8:  | Verwendete Antibiotika .....                                         | 43 |
| Tabelle 2.9:  | Verwendete Zelllinien.....                                           | 44 |
| Tabelle 2.10: | Verwendete Bakterienstämme .....                                     | 44 |
| Tabelle 2.11: | Verwendete <i>Toxoplasma gondii</i> -Stämme .....                    | 44 |
| Tabelle 3.1:  | Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.....                       | 57 |

---

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |                                                  |
|------------------|--------------------------------------------------|
| A                | Adenosin                                         |
| Abb.             | Abbildung                                        |
| A <sub>260</sub> | Absorption bei 260 nm                            |
| A <sub>280</sub> | Absorption bei 280 nm                            |
| AIDS             | Acquired immune deficiency syndrome              |
| AK               | Antikörper                                       |
| Amp              | Ampicillin                                       |
| APS              | Ammoniumperoxodisulfat                           |
| AS               | Aminosäuren                                      |
| ATP              | Adenosin-Triphosphat                             |
| bp               | Basenpaar(e)                                     |
| BSA              | Rinderserumalbumin                               |
| bzw.             | beziehungsweise                                  |
| C                | Cytosin                                          |
| °C               | Grad Celsius                                     |
| CAT              | Chloramphenicol-Acetyltransferase                |
| cDNA             | komplementäre DNA                                |
| cpm              | counts per minute                                |
| cy <sup>2</sup>  | Cyanine                                          |
| cy <sup>3</sup>  | Indocarbocyanine                                 |
| DAPI             | 4'6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochloridhydrat |
| dATP             | Desoxyadenosin-Triphosphat                       |
| dCTP             | Desoxycytosin-Triphosphat                        |
| dGTP             | Desoxyguanosin-Triphosphat                       |
| dNTP             | Desoxynukleosid-Triphosphat                      |
| dTTP             | Desoxythymidin-Triphosphat                       |
| DEPC             | Diethylpyrocarbonat                              |
| DG               | Dichte-Granula („dense granules“)                |
| DNA              | Desoxyribonukleinacid                            |
| DNAse            | Desoxyribonuklease                               |

---

|              |                                        |
|--------------|----------------------------------------|
| ds           | doppelsträngig                         |
| DTT          | Dithiothreitol                         |
| EDTA         | Ethylendiamintetraacetat               |
| EGTA         | Ethylenglycoltetraacetat               |
| ESA          | excreted-secreted Antigene             |
| EST          | expressed sequence Tag                 |
| EtOH         | Ethanol                                |
| FCS          | fötales Kälberserum                    |
| G            | Guanosin                               |
| GPI-Proteine | Glycosyl-Phosphatidylinositol-Proteine |
| GRA          | Dichte-Granula Antigen                 |
| GTP          | Guanosin-Tetraphosphat                 |
| h            | Stunde(n)                              |
| HIV          | Human Immunodeficiency Virus           |
| HSP          | High-speed-pellet                      |
| HSS          | High-speed-supernatant                 |
| IFN          | Interferon                             |
| IFA          | Immunfluoreszenzanalyse                |
| Ig           | Immunglobulin                          |
| IPTG         | Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranosid  |
| kb           | Kilobasen                              |
| kDa          | Kilodalton                             |
| LB           | Luria-Bertani-Medium                   |
| LDH          | Lactatdehydrogenase                    |
| LSP          | Low-speed-pellet                       |
| LSS          | Low-speed-supernatant                  |
| M            | Molar                                  |
| mM           | Millimolar                             |
| min          | Minuten                                |
| ml           | Milliliter                             |
| MIC          | Micronemenprotein                      |
| MOPS         | 3-[N-Norpholino]propansulfonsäure      |
| MW           | Molekulargewicht                       |

---

|       |                                      |
|-------|--------------------------------------|
| μl    | Mikroliter                           |
| μM    | Mikromolar                           |
| NO    | Stickstoffmonoxid                    |
| NT    | Nukleotide                           |
| OD    | Optische Dichte                      |
| ORF   | offener Leserahmen                   |
| PAA   | Polyacrylamid                        |
| PAGE  | Polyacrylgelelektrophorese           |
| PBS   | Phosphate Buffered Saline            |
| PCR   | Polymerase-Ketten-Reaktion           |
| PV    | Parasitophore Vakuole                |
| PVM   | Membran der Parasitophoren Vakuole   |
| RNA   | Ribonukleinsäure                     |
| ROP   | Rhoprienprotein                      |
| RT    | Raumtemperatur                       |
| s     | Sekunden                             |
| SAG   | Surface Antigen                      |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat                 |
| ss    | einzelsträngig                       |
| SSC   | Citrat-gepufferte Salzlösung         |
| T     | Thymin                               |
| TBE   | Tris-Borat-EDTA Puffer               |
| TCA   | Trichloressigsäure                   |
| TEMED | N, N, N, N,-Tetramethylethylendiamin |
| TLA   | Toxoplasmenlysat                     |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor α                 |
| Tris  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan      |
| U     | Uracil                               |
| ü. N. | über Nacht                           |
| UTP   | Uridin-Triphosphat                   |
| v/v   | Volumenprozent                       |
| w/v   | Gewichtsprozent                      |
| z. B. | zum Beispiel                         |

## 1. Einleitung

### 1.1. *Toxoplasma gondii*-Taxonomie und Bedeutung

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), der Erreger der Toxoplasmose, ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der alle kernhaltigen Zellen warmblütiger Tiere infizieren kann (Gross und Böhne, 1994). *T. gondii* wurde erstmals 1908 von C. Nicolle und L. Manceaux beschrieben, die den Parasiten aus dem nordafrikanischen Wüstennagetier *Ctenodactylus gondi* isolierten, (Nicolle und Manceaux, 1908) und ihm später aufgrund seiner gebogenen Form (griechisch: Toxon = Bogen; plasma = Form) und seinem Fundort, den Namen *Toxoplasma gondii* gaben. Die vollständige Beschreibung des Parasiten und seines Lebenszyklus gelang jedoch erst in den späten 60er Jahren des 20. Jahrhunderts (Frenkel *et al.*, 1970; Sheffield und Melton, 1968).

Taxonomisch wird *T. gondii* innerhalb der Protozoen (Einzeller) dem Stamm der Apikomplexa, genauer der Ordnung der Coccidien (Levine, 1980) zugeordnet. Zum Stamm der Apikomplexa gehören etwa 5000 Arten, wie beispielsweise die humanpathogenen Parasiten *Plasmodium falciparum* (Erreger der Malaria, an der 300-500 Millionen Menschen erkrankt sind) und *Cryptosporidium parvum* (Verursacher von Diarrhoe bei Immunsupprimierten). Des Weiteren werden tierpathogene Erreger wie Neospora, Sarcocystis und Theileria dem Stamm zugeordnet.

Die Bezeichnung „Apikomplexa“ bezieht sich auf einen charakteristisch strukturierten Apikalkomplex, den alle vegetativen Stadien dieses Stammes besitzen. Der Komplex beinhaltet spezialisierte sekretorische Organellen wie Rhoptrien und Mikronemen sowie komplexe zytoskelettale Elemente (Conoid), die als Penetrationsapparat für das Eindringen in die Wirtszelle benötigt werden (Dubey, *et al.*, 1998).

Infolge des extrem breiten Wirtsspektrums gehört *T. gondii* heutzutage zu dem am weitesten verbreiteten Parasiten der Welt. Nach Schätzungen sind 10-25 % der gesamten Weltbevölkerung mit *T. gondii* infiziert (Sibley und Howe, 1996), wobei aufgrund von Alter, Ort und Ernährungsgewohnheiten starke Unterschiede zu verzeichnen sind. In Mitteleuropa liegt die Zahl der Toxoplasma-positiven Einwohner bei 70 % (Hermentin und Aspöck, 1987). In den USA gehört *T. gondii*, neben Listerien und Salmonellen, zu den wichtigsten über Nahrungsmittel vermittelten Infektionserregern (Mead *et al.*, 1999).

## 1.2. Pathogenese

Die Hauptinfektionsquelle für den Menschen liegt im Verzehr von Zysten-haltigem rohem bzw. ungenügend erhitztem Fleisch oder im Kontakt mit Katzenkot, der sporulierende Oozysten enthält. Diese Oozysten können unter optimalen Bedingungen über mehrere Jahre infektiös bleiben (Aramini *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass bei ausreichender Dosis jeder Kontakt mit *T. gondii* zu einer Infektion führt. Je nach Infektionszeitpunkt wird zwischen einer postnatalen Toxoplasmose und einer pränatal (konnatal) erworbenen Toxoplasmose unterschieden.

### 1.2.1. Postnatale Toxoplasmose

Trotz einer hohen Durchseuchungsrate führt eine *T. gondii*-Infektion nur selten zu klinisch manifesten Symptomen. Der Verlauf einer Infektion zeigt sich stark abhängig vom Alter und vom Immunstatus des jeweilig Betroffenen (Kayser *et al.*, 1993). In der Regel verläuft die Infektion symptomlos oder äußert sich wie ein leichter grippaler Infekt mit schmerzloser Lymphadenopathie, Müdigkeit, Kopfschmerz und gelegentlich auftretendem Fieber, wobei eine medikamentöse Behandlung jedoch im Regelfall nicht erforderlich ist.

Während der akuten Phase wird durch den Einsatz der körpereigenen Immunabwehr die weitere Parasitenvermehrung eingeschränkt. Der Parasit bildet jedoch Zysten aus, die bevorzugt im Gewebe der Muskulatur, im Auge und in den Neuronen des Zentralnervensystems (ZNS) im Gehirn lokalisiert sind. Mit Ausbildung der Gewebszysten geht die Toxoplasma-Infektion in die klinisch asymptomatische chronische Phase über. Eine bestehende oder abgelaufene *T. gondii*-Infektion kann durch die Bestimmung spezifischer Antikörper im Serum nachgewiesen werden.

Die *T. gondii*-Infektion wird in erster Linie durch die zelluläre Immunabwehr des Wirtes kontrolliert, wobei das Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) eine zentrale Funktion übernimmt (Subauste und Remington, 1991). Durch einen Anstieg des IFN- $\gamma$  in der akuten sowie in der chronischen Phase der Infektion wird die Induktion antimikrobieller Effektormechanismen in den infizierten Wirtszellen bewirkt, wodurch eine Proliferation von *T. gondii* unterbunden wird.

Sofern eine entsprechende Immunantwort nicht stattfinden kann, wie es bei nicht Immunkompetenten, wie z. B. AIDS-Erkrankten (McCabe und Remington, 1988; Luft und Remington, 1992), Organtransplantat-Empfängern oder anderen immunsupprimierten Personen



wie Tumorpatienten (Israelski und Remington, 1993b) der Fall ist, besteht die Gefahr einer Reaktivierung der chronischen Infektion. Bei der Reaktivierung erfolgt aus dem Bradyzoitenstadium (Dauerstadium) eine Differenzierung in das Tachyzoitenstadium, das sich durch eine hohe Replikationsrate auszeichnet (Kayser *et al.*, 1993). Die hierdurch induzierte Toxoplasmen-Enzephalitis, einhergehend mit multiplen cerebralen Läsionen (Wong und Remington, 1993; Ambroise-Thomas und Pelloux, 1993; Luft *et al.*, 1993), kann sich bei den Betroffenen unter anderem durch Desorientierung, Krampfanfälle, Sprachstörungen sowie Einschränkungen im Bewegungsablauf äußern und unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod führen (Luft und Remington, 1992).

### 1.2.2. Pränatale Toxoplasmose

Im Gegensatz zur so genannten postnatalen Toxoplasmose äußert sich die pränatale *T. gondii*-Infektion schwerwiegender. Bei einer auftretenden Erstinfektion in der Schwangerschaft kann es zu starken Schädigungen des Fötus kommen. Bei der Infektion breiten sich die Parasiten über das Blut und die Lymphe im gesamten Organismus der Mutter aus und können durch eine diaplazentare Übertragung den Fötus infizieren und ihn aufgrund seines unreifen Immunsystems schwer schädigen.

Die Folgen einer pränatalen Infektion reichen von Totgeburten und Aborten als schwerster Form der Schädigung über die Entwicklung eines Hydrozephalus und einer geistigen Retardierung bis hin zu leichten Entwicklungsstörungen (Sever *et al.*, 1988). Bei 80-90 % der bei der Geburt klinisch unauffälligen Neugeborenen treten bis zum 20-sten Lebensjahr Spätschäden auf, die sich überwiegend in Form einer Chorioretinitis mit drohender Erblindung äußern (Koppe *et al.*, 1986).

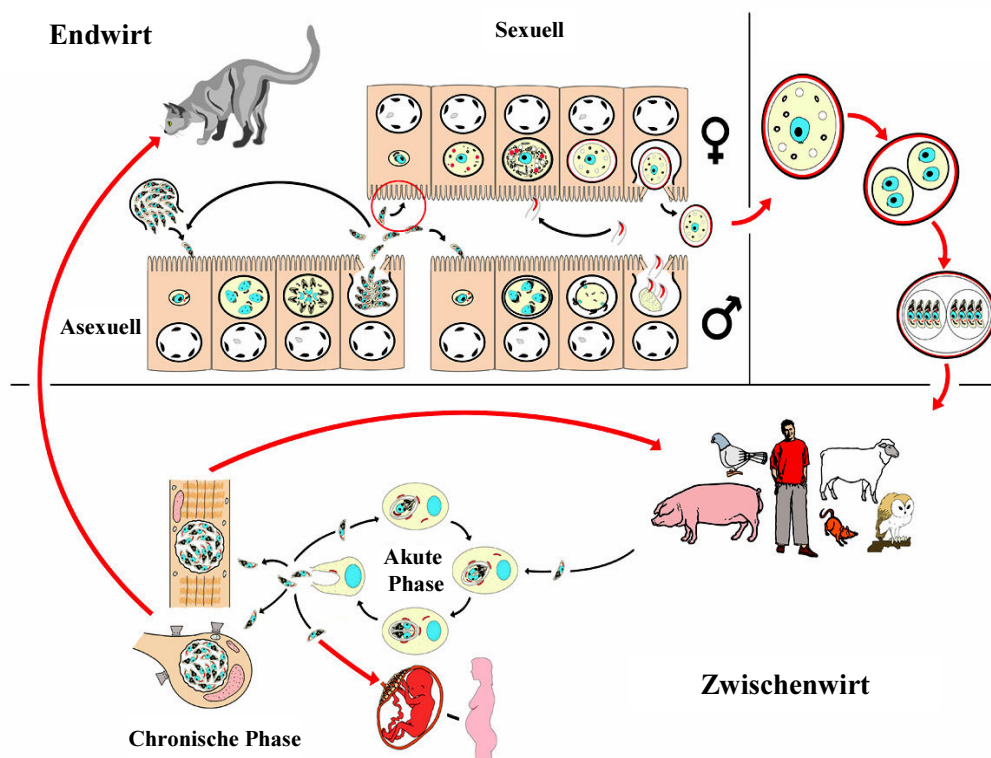
Die schwersten klinischen Manifestationen treten bei einer Infektion im ersten Trimenon der Schwangerschaft auf (Desmonts und Couvreur, 1974). Während die Übertragungswahrscheinlichkeit von der Mutter auf das Ungeborene zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft deutlich zunimmt, nimmt der Schweregrad der klinisch manifesten Schädigungen jedoch deutlich ab (Djurkovic-Djakovic, 1995; Wong und Remington, 1993). Bei einer Erstinfektion in der Schwangerschaft führen 25 % der mütterlichen Infektionen im ersten Trimenon sowie 65 % der *T. gondii*-Infektionen, die im letzten Trimenon erworben wurden, zu einer kongenitalen Infektion. Eine *T. gondii*-Infektion stellt demnach, hauptsächlich für Ungeborene sowie immunsupprimierte Menschen, eine Gefahr dar.

### 1.3. Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* kann während seines Vermehrungszyklus in drei verschiedenen Stadien vorkommen: als Tachyzoiten bzw. Bradyzoiten im Zwischenwirt und Endwirt, sowie als Sporozoiten. Als Zwischenwirt können alle warmblütigen Vertebraten einschließlich des Menschen fungieren, wohingegen die geschlechtliche Vermehrung ausschließlich im Dünndarmepithel der Hauskatze oder anderer Angehöriger der Felidae-Familie stattfindet (Lindsay *et al.*, 1991; Dubay *et al.*, 1998). Die unter der asexuellen Fortpflanzung vorkommenden Tachyzoiten treten während der akuten Phase einer *T. gondii*-Infektion auf und zeichnen sich durch eine schnelle Replikation (griechisch: tachos = schnell) mit einem durchschnittlichen Reproduktionszyklus von sechs bis neun Stunden (*in vitro*) aus. Sie besitzen eine Länge von ca. 5 µm und eine Breite von 2 µm. Während der Infektion vermehren sie sich ungeschlechtlich innerhalb einer membranbegrenzten Parasitophoren Vakuole bis zu einer Anhäufung von bis zu 128 Parasiten (Radke und White, 1998). Nach sieben entsprechend vollzogenen Teilungen werden die Tachyzoiten, durch Platzen der Wirtszelle, freigesetzt (Joiner und Dubremetz, 1993) und können durch aktives Eindringen neue Zellen infizieren (Dobrowolski und Sibley, 1996).

Im Rahmen dieser akuten Infektionsphase kommt es zu einer rasanten Vermehrung der Toxoplasmen in vielen Organen, wobei Leber, Lymphknoten und Lunge die Hauptorte der schnellen Replikation darstellen (Frenkel, 1988). Um sich der im Verlauf der akuten Infektion entwickelnden Immunantwort des Betroffenen zu entziehen, können sich die Tachyzoiten in infizierten Wirten in ein langsam wachsendes Bradyzoitenstadium (griechisch: brady = langsam) differenzieren, wobei ein teilweiser Antigenwechsel stattfindet und die Parasitophore Vakuole in eine Zystenhülle umgewandelt wird (Ferguson und Hutchison, 1987; Dubey *et al.*, 1998). Im Vergleich zu den Tachyzoiten zeichnen sich die Bradyzoiten durch eine stark verminderte Replikationsrate sowie einen verlangsamten Metabolismus aus (Bohne *et al.*, 1999). Die ausgebildeten Zysten besitzen eine Größe von ca. 150 µm und können erstmals ca. sieben bis zehn Tage nach der Infektion im Gewebe nachgewiesen werden. In diesem Ruhestadium kann der Parasit lebenslang in seinem Zwischenwirt persistieren, ohne dass im immunkompetenten Wirt klinische Symptome auftreten (Bohne *et al.*, 1999). Abhängig vom Zwischenwirt häufen sich Bradyzoiten-haltige Zysten bevorzugt in den Neuronen des Zentralen Nervensystems (ZNS), im Muskelgewebe, in der Retina und zu einem geringen Teil in anderen Geweben an (Israelski und Remington, 1993a; Dubey *et al.*, 1998). Werden die

Zysten über Nahrung wie beispielsweise infiziertes und nicht ausreichend gekochtes Fleisch aufgenommen, werden die Bradyzoiten durch Aufbruch der Zystenhülle im Magen freigesetzt. Die säure- und pepsinresistenten Bradyzoiten infizieren die Epithelzellen des Dünndarms, in denen sie sich wiederum zur schnell replizierenden Form, den Tachyzoiten, differenzieren (Pettersen, 1979; Jacobs *et al.*, 1960), die sich im ganzen Körper ausbreiten und eine akute Infektion mit anschließender chronischer Infektion und Zystenbildung bedingen können. Nach oraler Aufnahme eines Zysten-haltigen Zwischenwirts (z.B. Maus) durch eine Katze, den Endwirt des Parasiten, wird die Zystenwand im Magen der Katze aufgelöst und der haploide Parasit dringt in die Zellen des Dünndarmepithels ein. In den Darmzellen durchläuft der Parasit mehrere asexuelle Teilungsschritte, bevor er sich zur sexuellen Vermehrung in männliche und weibliche Gametozyten, die Mikro- und Makrogameten ausdifferenziert, die nach Verschmelzung eine diploide, ca.  $9 \times 14 \mu\text{m}$  große Oozyste ausbilden (Freyre *et al.*, 1989).



**Abb. 1.1: Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii***

Der Lebenszyklus von *T. gondii* unterteilt sich in eine sexuelle und eine asexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung (Gametogonie) von *T. gondii* erfolgt ausschließlich während der intestinalen Phase in seinem Endwirt, den Feliden. Die asexuelle Vermehrung erfolgt in der externen Phase außerhalb des Wirtes über Sporogonie sowie unendlich oft in der extraintestinalen Phase in den Zwischen- sowie den Endwirten (Coppin *et al.*, 2003).

Die unsporulierten Oozysten werden, nach Aufplatzen der Darmepithelzellen, mit der Faeces der Katze ausgeschieden und sporulieren innerhalb von zwei bis vier Tagen zu hochinfektiösen Sporozoiten. Aufgrund einer außerordentlichen Widerstandsfähigkeit in feuchter Umgebung bleibt die Infektiösität der Oozysten über Monate bis Jahre erhalten. Nach oraler Aufnahme der Oozysten über kontaminierte Nahrung, Wasser oder Erde, werden die, durch Meiose entstandenen, acht Sporozoiten im Darmepithel des neuen Wirts freigesetzt und differenzieren sich zu Tachyzoiten, womit sich der *T. gondii*-Infektionszyklus schließt.

In der Katze kann ferner eine Kreuzung von verschiedenen *T. gondii*-Isolaten erfolgen (Sibley *et al.*, 1992). Erforderlich dafür ist, dass der Endwirt simultan mit zwei verschiedenen *T. gondii*-Isolaten infiziert sein muss, um unter der sexuellen Vermehrungsphase eine Verschmelzung von Makro- und Mikrogameten beider Isolate zu gewährleisten.

#### 1.4. Diagnose der Toxoplasmose

Die Diagnose einer *T. gondii*-Infektion erfolgt in erster Linie serologisch über den Nachweis Parasiten-spezifischer IgM- und IgG-Antikörper. Bereits eine Woche nach einer Infektion lassen sich über einen IgM-Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (IgM-ELISA) IgM-Antikörper im Blut des Infizierten nachweisen (Desmonts *et al.*, 1981). Deren Konzentration erreicht innerhalb von zwei bis vier Wochen Maximalwerte und sinkt anschließend im Normalfall im Verlauf weniger Monate unter die Nachweisgrenze ab. Zudem kann der Nachweis von IgA- bzw. IgE-Antikörpern als Indikator einer frischen, aktiven *T. gondii*-Infektion herangezogen werden (Takahashi und Rossi., 1994; Pinon *et al.*, 1990).

IgG-Antikörper können dagegen erst später nachgewiesen werden. Sie erreichen nach ca. zwei bis vier Monaten die höchste Konzentration und persistieren über viele Jahre im Blut. Ansteigende IgG-Titer sowie der Nachweis von IgM- und IgA-Antikörpern sind ein Indiz für eine akute *T. gondii*-Infektion (Kayser *et al.*, 1993). Der alleinige Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern ist ein Anzeichen für eine latente bzw. chronische Toxoplasmen-Infektion.

Der direkte *T. gondii*-Erregernachweis gestaltet sich dagegen schwierig und wird gegebenenfalls bei der Untersuchung immundefizienter Patienten oder zur Abklärung kongenitaler Infektionen herangezogen. Für einen Nachweis wird Biopsie- oder Organmaterial, wie z.B. Lymphknotenpunktat oder Plazentagewebe auf Toxoplasma-freie Mäuse übertragen. Die Mäuse werden nach ca. drei bis sechs Wochen serologisch oder durch eine Sektion auf eine *T. gondii*-Infektion untersucht. Aufgrund der langen Dauer des Mäuseinokulationstests

wird heute vermehrt die Züchtung von Toxoplasmen in Zellkulturen durchgeführt, wodurch erste Resultate bereits nach wenigen Tagen vorliegen können. Diese aufwendigen Tierversuchs- und Zellkulturmethoden werden nur in wenigen Speziallaboratorien durchgeführt.

Als empfindlichste und schnellste Methode kann, bei nicht eindeutigen serologischen Befunden die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis von *T. gondii*-DNA in Blut, Liquor, Fruchtwasser oder Gewebeproben herangezogen werden (Gross *et al.*, 1992). Die Diagnostik mit Hilfe der PCR bietet sich besonders bei AIDS-Patienten an. Unter Umständen kann sich, trotz einer Infektion, der Nachweis spezifischer Antikörper bei diesen Betroffenen als schwierig erweisen und somit eine rechtzeitige Therapie versäumt werden.

## 1.5. Therapie der Toxoplasmose

Eine Behandlung der *T. gondii*-Infektion sollte bei akuten und subakuten Infektionen mit Krankheitserscheinungen, sowie bei einer symptomatischen oder asymptomatischen Erstinfektion von Schwangeren erfolgen. Das primäre Ziel der Therapie besteht darin, die Vermehrung der Parasiten im Verlauf der akuten Phase zu unterbinden. Die Behandlung einer *T. gondii*-Infektion erfolgt nach derzeitigem Stand mit einer Kombination aus Sulfonamid und Pyrimethamin (Daraprim) (Tenant-Flowers *et al.*, 1991) oder als Monotherapie mit dem Antibiotikum Spiramycin (Rovamycine) im 1. Trimenon der Schwangerschaft. Aufgrund der potentiellen Gefahr einer teratogenen Schädigung des Ungeborenen sollte eine Behandlung mit Sulfonamid und Pyrimethamin erst nach der 15. Schwangerschaftswoche erfolgen. Durch den Einsatz von Pyrimethamin wird eine Hemmung der Dehydrofolatreduktase bewirkt, wohingegen Sulfadiazin die Dehydrofolatsynthese blockiert (Ruf und Pohle, 1995). Im Rahmen der Therapie mit Sulfonamid und Pyrimethamin können jedoch Störungen des Folsäurestoffwechsels auftreten, die Auswirkungen auf die Blutbildung haben. Aufgrund dessen wird zur Vorsorge zusätzlich die Gabe von Folsäure empfohlen.

Vor der 15. Schwangerschaftswoche erfolgt eine Behandlung ausschließlich mit Spiramycin, wodurch die Proteinsynthese des Erregers gehemmt und damit die Transmission auf den Fötus unterbunden wird. Bei negativem Erregernachweis mittels der PCR kann Spiramycin auch als Monotherapie bis zur Geburt des Kindes eingesetzt werden (Gratzl *et al.*, 1998). Aufgrund der geringen Plazentagängigkeit ist eine Behandlung mit Spiramycin bei einer bereits erfolgten fetalen Infektion jedoch nicht ausreichend (Couvreur *et al.*, 1988).

Um eine *T. gondii*-Reaktivierung zu unterbinden, wird bei serologisch positiven, immunsupprimierten Patienten eine prophylaktische Verabreichung der Antibiotika Atovaquon, Azithromycin und Clarithromycin jeweils als Monotherapie oder in Kombination empfohlen. Die Behandlung führt jedoch nicht zur vollständigen Eliminierung des Parasiten, da die Dauerstadien der chronischen Phase, die so genannten Bradyzoiten, nicht angegriffen werden (Dubey *et al.*, 1998).

## 1.6. Einteilung und Virulenz von *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* kann jede kernhaltige Zelle infizieren und sich darin replizieren und hat daher als Modellorganismus für intrazelluläre Parasiten etabliert werden können. Aufgrund der einfachen Aufzucht in der Zellkultur existiert mittlerweile eine große Anzahl an tierischen und klinischen Isolaten, die global verstreut aus Tieren und Menschen isoliert wurden. Die Isolate können unterschiedlichen *T. gondii*-Stämmen zugeordnet werden, die untereinander sehr starke genetische sowie phänotypische Ähnlichkeiten aufweisen. Die Stämme werden aufgrund ihrer Mausvirulenz in drei klonale Linien differenziert, die als Typ I-, Typ II- und Typ III-Toxoplasmen bezeichnet werden. Eine Besonderheit ist, dass diese drei *T. gondii*-Stämme auch aufgrund morphologischer und genetischer Eigenschaften unterschieden werden können (Dardé *et al.*, 1992; Howe und Sibley, 1995; Grigg *et al.*, 2001; Sibley und Boothroyd, 1992).

In der Maus lassen sich hoch- von relativ gering- und avirulenten *T. gondii*-Stämmen unterscheiden. Bei einer intraperitonealen Infektion führen stark virulente Toxoplasmen (Typ I), zu denen u.a die Stämme RH und BK gezählt werden, in Mäusen zu einer letalen Infektion. Als ausreichende Dosis genügt dafür ein einzelner Tachyzoit, so dass die letale Dosis, mit einer 100 %-igen Mortalität (LD<sub>100</sub>), eins beträgt (Howe *et al.*, 1996). Im Rahmen der intraperitonealen Infektion bei Mäusen wird zunächst die Bauchhöhle als Infektionsort, und ausgehend davon die benachbarten Organe wie Milz und Mesenteriallymphknoten befallen, bevor der Parasit mit dem Blutstrom in die Lunge, die Leber und zuletzt in das Gehirn eindringt (Zenner *et al.*, 1998; Mordue *et al.*, 2001). Interessanterweise wurden Infektionen mit Typ I-Isolaten, obwohl diese relativ selten in Tieren zu finden sind, mit zunehmender Häufigkeit in Verbindung mit der humanen kongenitalen und okularen Toxoplasmose identifiziert (Fuentes *et al.*, 2001; Grigg und Boothroyd, 2001).

Bei einer Infektion von Mäusen mit schwach virulenten Stämmen (Typ II und III), wie ME49- oder DX-Toxoplasmen, liegt die Infektionsdosis bei über 1000 Parasiten, um eine Letalität von

50 % zu erzielen (LD<sub>50</sub>) (Sibley *et al.*, 2002). Typ II-Isolate finden sich besonders häufig bei der humanen chronischen Toxoplasmose sowie bei Tieren, die Teil der menschlichen Nahrungskette sind (Howe und Sibley, 1995). Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit ist die Virulenz in Mäusen das wichtigste phänotypische Kriterium, mit dem sich die Virulentypen I-III unterscheiden lassen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Virulenz der *T. gondii*-Stämme I-III in verschiedenen Maus-Inzuchtlinien unterschiedlich ist.

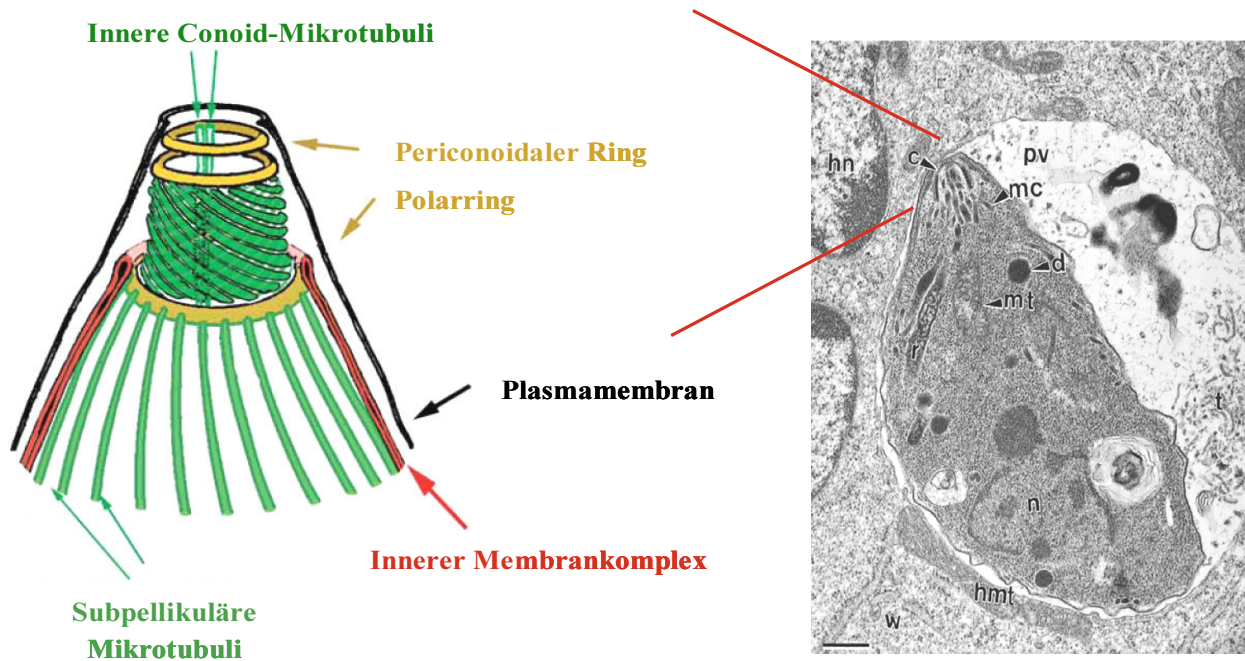
## 1.7. Tachyzoiten und Bradyzoiten

*Toxoplasma gondii* weist die klassischen Organellen einer eukaryotischen Zelle auf, wie z.B. den Zellkern, den Golgi-Apparat, das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mitochondrien. Das Trans-Golgi-Netzwerk fungiert dabei als „Sortierort“ für Proteine, die sekretiert oder zum ER zurücktransportiert werden müssen (Ngo *et al.*, 2000). Die im Zwischenwirt auftretenden, schnell replizierenden Tachyzoiten sowie die langsam wachsenden Bradyzoiten liegen in einer für Toxoplasmen charakteristisch gebogenen Form vor. Mit einer Länge von jeweils ca. 5 µm und einer Breite von jeweils ca. 2 µm sind sie ungefähr gleich groß (Weiss und Kim, 2000) und daher lichtmikroskopisch kaum voneinander zu unterscheiden. Beide Stadien sind jedoch ultrastrukturell durch verschiedene Organellen charakterisiert, die sich elektronenmikroskopisch identifizieren und unterscheiden lassen. Bei den Tachyzoiten liegt der Zellkern zentral in der Zelle, während er sich in Bradyzoiten am posterioren Pol befindet. Als Unterscheidungskriterium zwischen den beiden Lebensstadien dient zudem eine Anhäufung vieler Amylopektin-haltiger Granula in den Bradyzoiten, die nicht oder nur selten in den Tachyzoiten aufzufinden sind (Dubey *et al.*, 1998; Guerardel *et al.*, 2005). Diese Amylopektin-haltigen Granula spielen in den Bradyzoiten vermutlich eine Rolle bei der Energieversorgung des Dauerstadiums (Weiss und Kim, 2000). Bradyzoiten zeichnen sich durch eine deutlich reduzierte Wachstumsrate aus, einhergehend mit einer Umstellung des Energiestoffwechsels (Jerome *et al.*, 1998). Weiterhin ist in den Dauerstadien der Citratzyklus inaktiviert. Zudem fehlt eine funktionelle Atmungskette (Denton *et al.*, 1996), so dass die benötigte Energie über alternative Wege gewonnen wird.

Der Parasit grenzt sich von seiner Umwelt durch eine Pellikula ab, die aus insgesamt drei Membranen besteht: der Plasmamembran sowie zwei dicht übereinander liegenden Membranen (IMC1 und IMC2), die zusammen den so genannten inneren Membrankomplex ausbilden. Die umschließende Pellikula verläuft von präconoidalen Ringen am apikalen Pol bis

hin zum posterioren Pol des Parasiten (Dubremetz und Torpier, 1978) mit Aussparung im Bereich einer so genannten Mikropore. Bei der Mikropore handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Endozytose-Region, in der Clathrin-beladene Vesikel angereichert sind (Nichols *et al.*, 1994).

Am apikalen Pol des Parasiten befindet sich der für Apikomplexa typische Apikalkomplex, der sich aus dem Conoid, dem Polringkomplex, subpellikulären Mikrotubuli sowie zwei sekretorischen Organellen, den Rhoptrien und den Mikronemen zusammensetzt (Carruthers und Sibley, 1997; Dubey *et al.*, 1998; Black und Boothroyd, 2000). Eine dritte Klasse von sekretorischen Organellen, die Dichten-Granula, sind im gesamten Zytoplasma der Tachyzoiten und Bradyzoiten verteilt (Carruthers, 1999).



**Abb. 1.2: Das *Toxoplasma gondii*-Conoid**

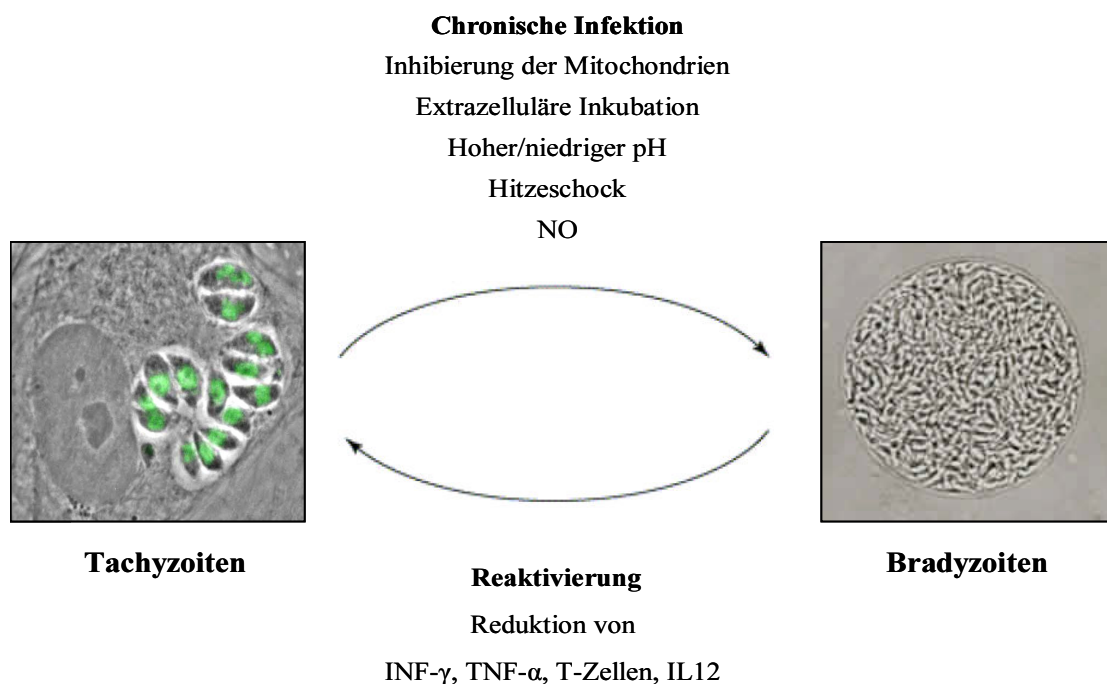
Das Diagramm stellt die Detailansicht des Apikalkomplexes von *T. gondii* dar. Der Apikalkomplex dient als Penetrationsapparat beim Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle. Der Apikalkomplex setzt sich aus einem periconoidalen Ring, dem Polarring, dem inneren Membrankomplex, den subpellikulären Mikrotubuli, umhüllt von einer Plasmamembran, zusammen (modifiziert aus Hu *et al.*, 2006).



Der Apikalkomplex dient als Penetrationsapparat beim Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle (Morrisette und Sibley, 2002). Das Conoid besteht aus spiralförmig verlaufenden Tubulin-Polymeren und ist mit den präconoidalen Ringen sowie dem Polringkomplex verbunden (Morrisette *et al.*, 1994). In extrazellulären Parasiten kann die Conoid-Struktur ausgefahren werden und rotierende Bewegungen ausführen, die das Eindringen in die Wirtszelle unterstützen (Hu *et al.*, 2002). Neben den Tubulin-Polymeren im Conoid besitzt der Parasit zweiundzwanzig subpellikuläre Mikrotubuli, die dem Parasiten die gebogene Form verleihen, sowie die apikale Polarität des Parasiten bedingen. Eine Verknüpfung der zweiundzwanzig Mikrotubuli erfolgt am so genannten „microtubuli organization center“, das am Polringkomplex lokalisiert ist (Nichols und Chiappino, 1987).

Des Weiteren gelten Bradyzoiten, im Gegensatz zu Tachyzoiten, als säure- und magensaftresistent. Sie können die Magenpassage unbeschadet überstehen (Jacobs *et al.*, 1960), wohingegen bei Tachyzoiten unter gleichen Bedingungen innerhalb kürzester Zeit ein vollständiger Verlust der Infektiösität stattfindet. In einer 50 bis 70 µm großen Gewebszyste liegen etwa 500 bis 2000 Bradyzoiten, die von einer 5 µm dünnen, elastischen Zystenwand umgeben sind. Die Zystenwand setzt sich aus Komponenten, wie Lektinen und Chinin, zusammen. Nach Aufnahme von zystenhaltiger Nahrung wird die Zystenwand im Verdauungstrakt durch Pepsin und Trypsin aufgelöst und die Peptidase-resistenten Bradyzoiten freigesetzt (Weiss und Kim, 2000). Die Bradyzoiten können Zellen direkt infizieren und müssen sich nicht erst in Tachyzoiten umwandeln. Ein weiteres Unterscheidungskriterium liegt in der antigenetischen Differenz von Tachyzoiten und Bradyzoiten (Kasper, 1989). Mit Hilfe von Antikörpern und T-Zell-Experimenten wurden Tachyzoiten-spezifische Oberflächenproteine, die als „surface antigene“ SAG1 und SAG2 bezeichnet werden, identifiziert (Burg *et al.*, 1988; Mineo *et al.*, 1993). Zusätzlich wird das Rhoprienprotein ROP9 (Reichmann *et al.*, 2002) als sekretiertes Protein nur in den Tachyzoiten nachgewiesen. Im Rahmen der Umwandlung vom Tachyzoiten zum Bradyzoiten findet eine Modifizierung der Tachyzoitenoberfläche statt, bei der die Oberflächenproteine SAG1 und SAG2 durch Proteine wie SAG4 und BSR4 ersetzt werden (Bohne *et al.*, 1999; Lekutis *et al.*, 2000). Mit monoklonalen Antikörpern konnten zudem weitere Bradyzoiten-spezifische Proteine definiert werden. Dazu zählen das „Bradyzoiten-Antigen“ BAG1, das zytoplasmatisch in den Bradyzoiten lokalisiert ist und das Protein p34, das auf der Bradyzoitenoberfläche exprimiert wird (Bohne *et al.*, 1995; Parmley *et al.*, 1995; Tomavo *et al.*, 1991). Weiterhin finden sich in der Zyste der Bradyzoiten das Zystenwandprotein CST1 sowie das Matrix-Antigen MAG1

(Parmley *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1992). Eine Differenzierung der infektiösen Tachyzoiten zu langsam wachsenden Bradyzoiten *in vitro* oder im Zwischenwirt erfolgt als Reaktion auf einen „Stresszustand“ wie Temperaturerhöhung oder Änderung des pH-Wertes (Weiss und Kim, 2000) und kann ebenfalls durch Zugabe von Chemikalien wie Natriumarsenit oder Pyrimethamin bewusst induziert werden (Soete und Dubremetz, 1996; Gross *et al.*, 1996). Nach Beseitigung dieser Stress-auslösenden Faktoren kann wiederum die Entwicklung von Bradyzoiten zu Tachyzoiten erfolgen. In der Maus vollzieht sich die Stadienkonversion infolge der steigenden Immunantwort auf die Infektion. Durch den vorliegenden „Immundruck“ wird in der Maus die Umwandlung der Tachyzoiten zu Bradyzoiten induziert, wohingegen bei der Reaktivierung einer chronischen Infektion bei Immunsuprimierten Bradyzoiten zu Tachyzoiten differenzieren (Gross *et al.*, 1996).



**Abb. 1.3: Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten**

Die Umwandlung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten ist ein reversibler Prozess, der durch diverse Arten von Stresseinfluss auf den Parasiten ausgelöst werden kann. Durch die Ausbildung des Zystenstadiums wird eine chronische Infektion hervorgerufen. Eine Reaktivierung mit Stadienkonversion verläuft spontan bei Beseitigung der Stress-auslösenden Faktoren, wie bei einer Immunsuppression. Links: Tachyzoiten mit charakteristischer Rosettenbildung in der Wirtszelle. Rechts: Zyste aus dem Gehirn einer chronisch infizierten Maus. Begrenzt von einer Zystenwand befinden sich Hunderte von Bradyzoiten im Inneren der Zyste.

## 1.8. Invasion von *Toxoplasma gondii* in die Wirtszelle

Der Invasionsprozess von *T. gondii* in die Wirtszelle verläuft, anders als bei vielen anderen intrazellulären Erregern, nicht über Phagozytose, sondern ist ein aktiv über Aktinfilamente vom Parasiten gesteuerter Vorgang (Dubremetz, 1998; Dobrowski und Sibley, 1996). Der gesamte Prozess vollzieht sich unauffällig für die Wirtszelle innerhalb von 15 Sekunden (Smith, 1995). Im Rahmen der Invasion nimmt der Parasit mit seinem apikalen Pol Kontakt zur Wirtszelloberfläche auf. Diese Kontaktaufnahme wird über spezifische Rezeptoren und Liganden gesteuert. Für einen Kontakt scheinen dabei sowohl Komponenten der Wirtszelle als auch des Parasiten verantwortlich zu sein. So bindet u.a. das parasitäre Laminin-Protein an die  $\alpha\beta 1$ -Untereinheiten des Integrin-Moleküls der Wirtszelle (Bonhomme *et al.*, 1999). Des Weiteren kommt es zur Anbindung des Tachyzoiten-Oberflächenproteins SAG1 an Neoglykolproteine auf der Wirtszelloberfläche (Mineo *et al.*, 1993; Fourmaux *et al.*, 1996; Ortega-Barria und Boothroyd, 1999). Der gesamte Vorgang der *T. gondii*-Bindung an die Wirtszelle konnte jedoch bis heute noch nicht vollständig identifiziert werden.

Nach Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle erfolgt eine Umorientierung des Parasiten, bis sich der Apikalkomplex und die Wirtszellmembran direkt gegenüberliegen. Diese Reorientierung erfolgt vermutlich über Mikronemenproteine (MIC-Proteine) die während der Ausrichtungsphase vom apikalen Pol des Parasiten sezerniert werden (Wan *et al.*, 1997; Lourenco *et al.*, 2001). Die Ausschüttung des Mikronemeninhalts wird dabei über eine Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der frühen Anheftungsphase induziert. Eine Rolle als entscheidendes, essentielles Protein wird dabei für das MIC2-Protein diskutiert. MIC2 bindet sowohl Laminin als auch Glykosaminyglykane, die Bestandteil der Heparansulfatglykan-Rezeptoren sind, und vermittelt dadurch eine breite Wirtsspezifität (Carruthers, 1999). Zusätzlich zu MIC2 (Huynh und Carruthers, 2006) sind die Mikronemenproteine MIC1, MIC3 und MIC4 als Adhäsine an der Invasion beteiligt. Sie tragen verschiedene „epidermal growth factor“- (EGF), Thrombospondin- und Integrin-ähnliche adhäsive Domänen (Soldati *et al.*, 2001). Für MIC1 konnte die Eigenschaft als Laktosebindendes Lektin nachgewiesen werden (Lourenco *et al.*, 2001).

Des Weiteren wird die Reorientierung über das Oberflächenprotein SAG2 des Parasiten unterstützt. Durch eine Maskierung des SAG2-Proteins mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern wurde der Parasit auf der Oberfläche der Wirtszelle immobilisiert und eine Umorientierung unterbunden (Smith, 1995; Grimwood und Smith, 1996). Nach erfolgreicher

Anlagerung des Parasiten wird an der Kontaktstelle eine feste Verbindung zwischen Parasit und Wirtszelle, eine so genannte „tight junction“ (Michel *et al.*, 1980), ausgebildet. Im Bereich dieser Kontaktausbildung sind die Zytoskelettstrukturen von Wirt und Parasit eng miteinander verbunden, sowie die Zellmembran der Wirtszelle zur bevorstehenden Invasion unterbrochen (Soldati *et al.*, 2001). Im Verlauf der Internalisierung von *T. gondii* wandert die „tight junction“ kreisförmig um den invadierenden Parasiten vom apikalen bis zum posterioren Pol („moving junction“), wobei aktiv Wirtszellproteine aus der Wirtszellmembran eliminiert werden (Pfefferkorn, 1990). Während der fortlaufenden Einstülpung der Wirtszellmembran wird zudem die Lipidanordnung in der Wirtszellmembran verändert (Dubremetz und Schwartzman, 1993).



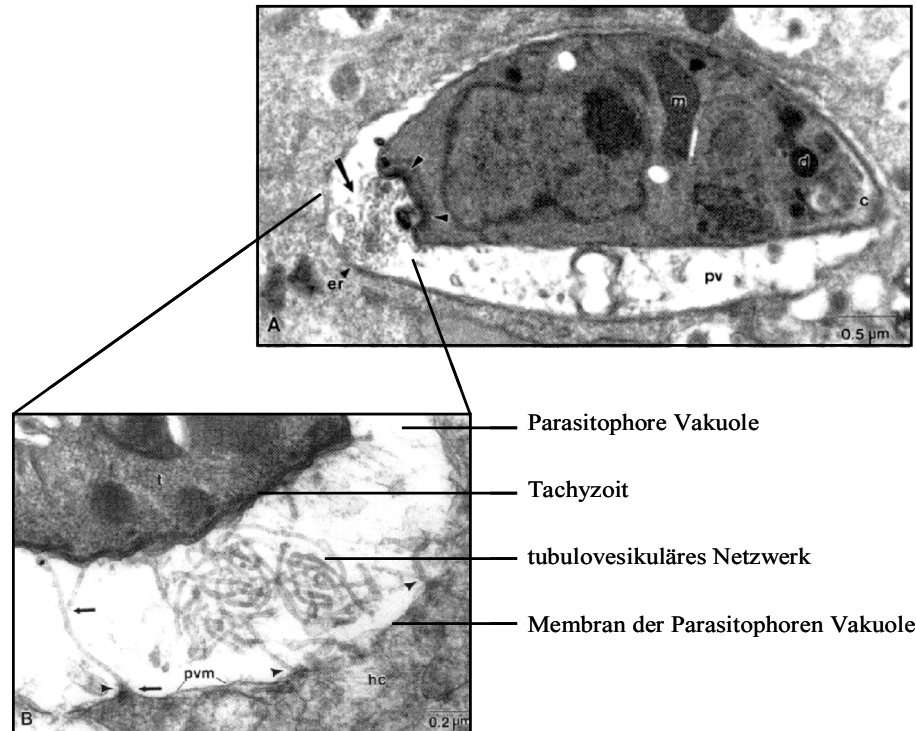
**Abb. 1.4: Invasion des *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten in die Wirtszelle**

Die Invasion des Parasiten in die Wirtszelle erfolgt mit Ausbildung einer „moving junction“, einer kreisförmigen, engen Verbindung zwischen der Pellikula des Parasiten und der Membran der Wirtszelle. Entlang der „moving junction“ dringt der Parasit aktiv mit schraubenförmigen Bewegungen in die Wirtszelle ein, wobei die Wirtszellmembran nach innen eingestülpt und zur Ausbildung der entstehenden Parasitophoren Vakuole genutzt wird. Im Rahmen des Invasionsprozesses werden dabei Wirtszellproteine aktiv von der Wirtszellmembran eliminiert. Mj: moving junction; Tv: tubulovesikuläre Membranstruktur; Dg: Dichte Granula; Rh: Rhoptrien; Nu: Nukleus; Am: Amylopektin Granula. (Dubey *et al.*, 1998).

Nach Abschluss des Invasionsprozesses liegt der Parasit in einer intrazellulären Parasitophoren Vakuole (PV) vor (Lingelbach und Joiner, 1998), deren umschließende Membran (PVM) ursprünglich der Wirtszellmembran entstammt. Die Membran wurde selektiv weitgehend von den Wirtszellproteinen befreit (Suss-Toby *et al.*, 1996; Mordue *et al.*, 1999) und durch Proteine der Rhoptrien ersetzt (Carruthers und Sibley, 1997; Beckers *et al.*, 1994). Trotz eines effizienten Ausschlusses von Transmembran-Proteinen der Wirtszellmembran verbleiben einige GPI-verankerte Wirtsproteine und Proteine ohne zytoplasmatische Domäne in der PVM (Mordue *et al.*, 1999). Durch eine Modifikation der PV-Membran wird verhindert, dass die Vakuole mit endozytotischen Wirtskompartimenten fusioniert und ihr Inhalt in Lysosomen degradiert wird (Sibley, 1995; Joiner *et al.*, 1990; Hakansson *et al.*, 2001). Ebenso findet keine Verschmelzung mit Vesikeln statt, die während des Eindringens des Parasiten in die Wirtszelle aufgenommen wurden. Eine Azidifikation dieser zeitgleich aufgenommenen Vesikel ist jedoch nicht gestört (Jones und Hirsch, 1972). Damit stellt die PV ein „sicheres“ Kompartiment dar, in dem der Parasit seine intrazelluläre Replikation ungestört durchführen kann.

Im Verlauf der intrazellulären Entwicklung von *T. gondii* reift die Parasitophore Vakuole zu einem spezialisierten Kompartiment heran. Sie bildet eine sichere Barriere zwischen dem Parasiten und dem Zytosol der infizierten Wirtszelle. Durch integrierte Poren fungiert die Membran als ein molekulares Sieb, das die Aufnahme von Nährstoffen, sowie einen Metabolitenaustausch zwischen Wirt und Parasit ermöglicht. Über porenartige Strukturen erfolgt ein Transport von Ionen und Molekülen bis zu einer Größe von 1300 Da (Schwab *et al.*, 1994). Der vom Parasiten gesteuerte Ionentransport innerhalb der PV führt bereits kurz nach der Infektion zu einer Hyperpolarisation der Wirtszellmembran (Bouchot *et al.*, 2001). Mit Hilfe von eingelagerten Rezeptoren in die Membran der Parasitophoren Vakuole (PVM) können zudem Lipide wie Cholesterol aktiv aufgenommen werden (Charron und Sibley, 2002). Zur Stabilisierung der Parasitophoren Vakuole bildet sich innerhalb von zehn bis zwanzig Minuten nach der Invasion ein tubulovesikuläres Netzwerk in der PV aus (Mercier *et al.*, 2002). Ausgehend vom posterioren Pol des Tachyzoiten durchzieht die Netzwerkstruktur den gesamten vakuolären Raum und bildet längliche Tubuli mit einem Durchmesser von 60 bis 90 nm. Über dieses Netzwerk wird eine Verbindung zwischen dem Parasiten und der PVM geschaffen, die möglicherweise dem Parasiten eine Aufnahme sowie den Transport essentieller Nährstoffe wie Nukleotide, Aminosäuren, Co-Faktoren und einfacher Zucker aus dem extrazellulären Milieu ermöglicht (Mercier *et al.*, 1998; Lauer *et al.*, 1997; Sibley, 2003). Bereits innerhalb der ersten zehn Minuten nach der Invasion werden zudem Dichte-Granula

vom apikalen Pol des Parasiten in die Parasitophore Vakuole ausgeschüttet, die eine Etablierung und Reproduktion des Parasiten in der PV unterstützen.



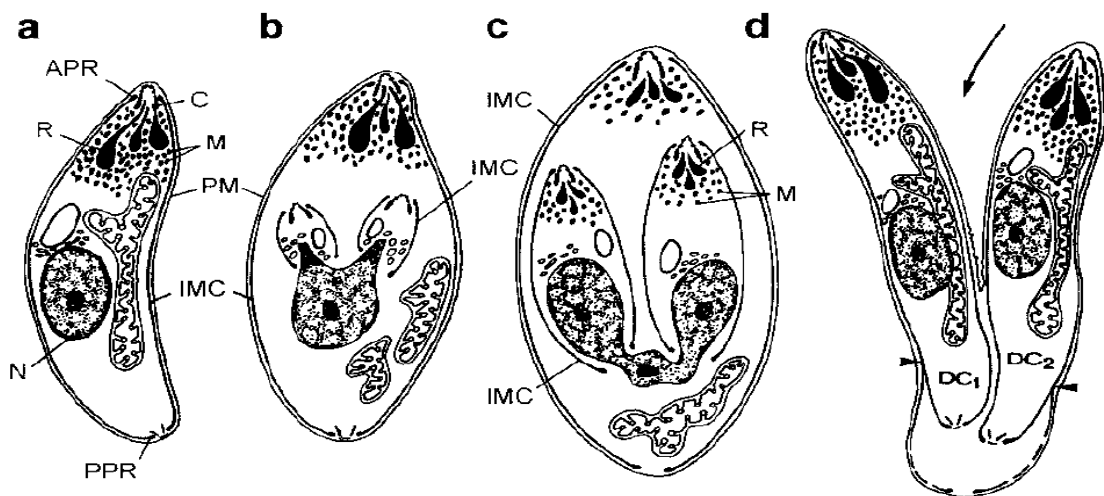
**Abb. 1.5: Ausbildung des tubulovesikulären Netzwerks innerhalb der PV**

Zur Stabilisierung der PV modifiziert *T. gondii* die Vakuole durch Ausbildung einer tubulomembranösen Netzwerkstruktur, die ausgehend vom posterioren Pol des Tachyzoiten den gesamten vakuolären Raum durchzieht. Das Netzwerk besteht aus länglichen Tubuli, die eine Verbindung zwischen dem Parasiten und der PVM schaffen. Zusätzlich zur erhöhten Stabilität werden über das Netzwerk die Aufnahme sowie der Transport essentieller Nährstoffe aus dem extrazellulären Milieu ermöglicht. Pv: Parasitophore Vakuole; pvm: Membran der Parasitophoren Vakuole; c: Conoid; er: Endoplasmatisches Retikulum; d: Dichte-Granula; hc: Wirtszelle. (modifiziert aus Sibley *et al.*, 1995).

## 1.9. Asexuelle Vermehrung und Egression aus der Parasitophoren Vakuole

Die Replikation von *T. gondii* erfolgt innerhalb der Parasitophoren Vakuole durch Endodyogenie (van der Zypen und Piekarski, 1967). Im Rahmen dieser asexuellen Vermehrung entstehen in einer Parasitenzelle aufgrund von Längsteilung zwei Tochterzellen. Durch Generierung eines zusätzlichen Apikalkomplexes im Mutterzellzytoplasma wird die bevorstehende Teilung des Parasiten eingeleitet. Die für diesen Prozess notwendigen zellulären Signale sind jedoch weitestgehend unbekannt. Bei der Endodyogenie beschränkt sich die

Teilung zunächst auf den Apikoplasten sowie die Mitochondrien, die auf die entstehenden Tochterzellen aufgeteilt werden. Die Kernteilung findet nach Entstehung der neuen Mitochondrien und des Apikoplasten in einer unversehrten Kernhülle statt. Zusätzlich zur Kernmembran bilden sich zwei U-förmige innere Membrankomplexe (IMC = inner membrane complex) aus, die die Hälfte der Mutterzellorganelle umschließen. Der innere Membrankomplex wächst dabei parallel zur Entwicklung der Tochterzellen weiter voran. Die Teilung der beiden Tochterzellen erfolgt durch Ausbildung einer Teilungsfurche, die sich vom anterioren Pol bis hin zum posterioren Pol der beiden entstehenden Tochterzellen ausweitet. Während der Segregation, die überwiegend über Zytoskelettelemente ermöglicht wird (Goode *et al.*, 2000), werden die Plasmamembran sowie das Zytoplasma der Mutterzelle zwischen den beiden Tochterzellen aufgeteilt. Die gebildeten Tochterzellen treiben auseinander, bleiben jedoch über einen schmalen Bereich der ursprünglichen Mutterzelle, dem so genannten residual body, (Black und Boothroyd, 2000) verbunden.



**Abb. 1.6: Vermehrung der Toxoplasmen durch Endodyogenie**

Entwicklung von zwei Tochterzellen innerhalb einer Mutterzelle. a: Tachyzoit; b: beginnende Ausbildung der Tochterzellen; c: fortschreitende Tochterzellbildung; d: Ausbildung einer Teilungsfurche ausgehend vom anterioren Pol und Auseinanderdriften der gebildeten Tochterzellen (Delbac *et al.*, 2001).

Bei weiteren Replikationen führt diese Verbindung zur Formierung der *T. gondii*-Rosetten innerhalb der PV. Tachyzoiten teilen sich *in vitro* alle sechs bis neun Stunden. Nachdem sich in der PV etwa 128 Parasiten angesammelt haben, wird die Plasmamembran der Wirtszelle durch Lyse zerstört (Radke und White, 1998) und die Parasiten freigesetzt. Im Gegensatz zu *T. gondii*

erfolgt die Vermehrung anderer Apikomplexa-Parasiten, wie Plasmodium, Theileria, Babesia oder Eimeria über Schizogonie (Bannister und Mitchell, 1995; Hepler *et al.*, 1966; Jura *et al.*, 1983; Shaw und Tilney, 1992).

### **1.10. Die sekretorischen Organellen von *Toxoplasma gondii***

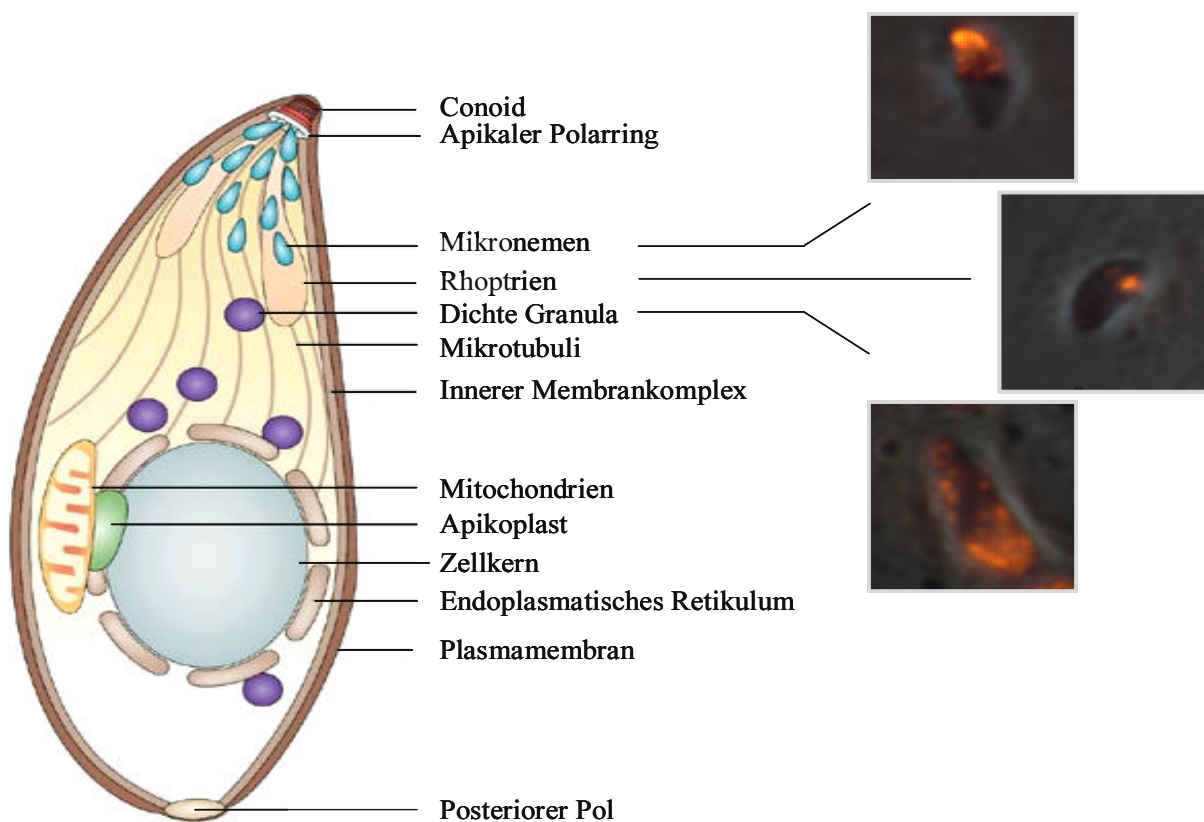
Als charakteristische sekretorische Organellen wurden in den Apikomplexa die Mikronemen, Rhoptrien und die Dichten-Granula identifiziert (Carruthers und Sibley, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass diese Organellen essentiell an der Invasion der Wirtszelle (Lovett *et al.*, 2002; Joiner und Roos, 2002; Sinai und Joiner, 2001) sowie an der gesamten intrazellulären Entwicklung des Parasiten beteiligt sind (Achbarou *et al.*, 1991; Mercier *et al.*, 2002). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Form und Lokalisation innerhalb des Parasiten sowie der Zusammensetzung ihrer Proteine lassen sich die drei Organellen deutlich voneinander abgrenzen. Eine Analyse, die eine gezielte Darstellung der verschiedenen Organellen *in vivo* ermöglicht, erfolgt in erster Linie über GFP-(green fluorescent protein) bzw. YFP-(yellow fluorescent protein) markierte sekretorische Proteine (Striepen *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 2000; Striepen *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2001; Radke *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2002; Swedlow *et al.*, 2002).

#### **1.10.1. Die Mikronemen**

Unter dem Elektronenmikroskop sind Mikronemen als kleine zigarrenförmige Organellen, die am apikalen Pol des Parasiten angereichert sind, zu erkennen. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten zwölf verschiedene Mikronemenproteine (MIC-Proteine) nachgewiesen werden, die mit MIC1-10 sowie TgAMA-1 und TgM2AP bezeichnet sind. Durch die Ausschüttung der MIC-Proteine wird eine gerichtete Adhäsion des Parasiten an die Wirtszelle gesteuert, um die Ausbildung der „tight junction“ zwischen dem Parasit und der Zelle zu gewährleisten (Lovett *et al.*, 2002). Wie auch bei *T. gondii* (Wan *et al.*, 1997) erfolgt die Ausschüttung der Mikronemen bei anderen Vertretern der Apikomplexa wie *Sarcocystis muris* (Entzeroth *et al.*, 1992) und *Eimeria tenella* (Tomley *et al.*, 1996) direkt nach Kontaktaufnahme mit der zu infizierenden Zelle. Die Initiation der MIC-Sekretion erfolgt durch Anreicherung von Calcium im Zytosol des Parasiten (Carruthers, 1999).



Als weitere Besonderheit ermöglichen die MIC-Proteine dem Parasiten ein Substrat-abhängiges Gleiten über Oberflächen zur Fortbewegung (Sibley *et al.*, 1998). Da *T. gondii*-Tachyzoiten nur über kurze Strecken gleiten, um benachbarte Zellen zu infizieren, besitzen sie, im Gegensatz zu anderen Apikomplexa-Stämmen, nur eine geringe Anzahl an Mikronemen. *Eimeria*-Sporozoiten verfügen im Gegensatz dazu über weit mehr Mikronemen, die ihnen ein schnelles und weites Gleiten über Oberflächen ermöglichen (Bumstead und Tomley, 2000).



**Abb. 1.7: Die subzellulären Organellen von *Toxoplasma gondii***

Ultrastrukturelle Darstellung der *T. gondii*-Organellen im Tachyzoiten mit Fokus auf die sekretorischen Organellen, die Mikronemen, Rhoptrien und Dichten-Granula. Gezielte Darstellung der sekretorischen Organellen *in vivo* durch Verwendung spezifischer MIC-, ROP- und GRA-Antikörper in der Immunfluoreszenzanalyse (Abbildung modifiziert aus Baum *et al.*, 2006).

### 1.10.2. Die Rhoptrien

Rhoptrien sind lang gestreckte, kegelförmige Organellen, die am apikalen Pol des Parasiten lokalisiert sind. Während der Invasion in die Wirtszelle wird der Inhalt der Rhoptrien (ROP-Proteine) über einen dünnen Kanal, über den die Organellen an den apikalen Pol angebunden sind, in die Parasitophore Vakuole (PV) entlassen. Bis jetzt konnten für *T. gondii* sieben verschiedene ROP-Proteine beschrieben werden (ROP1-7), sowie die Protein-Kinase ROP18. Die Funktion von ROP18 liegt darin, die intrazelluläre Proliferation von *T. gondii* kontrollierend zu beeinflussen (El Hajj *et al.*, 2007). Den ROP-Proteinen wird im Allgemeinen eine Funktion beim Aufbau der Parasitophoren Vakuole zugeschrieben. Aus der sich einstülpenden Wirtszellmembran werden aktiv Transmembran- sowie Membran-assoziierte Proteine entfernt und durch ROP-Proteine wie ROP1 und ROP2 ersetzt (Saffer *et al.*, 1992; Carruthers und Sibley, 1997; Joiner und Roos, 2002).

Die Funktion des ROP2 besteht u.a. darin, eine dichte Anlagerung des Endoplasmatischen Retikulums sowie der Mitochondrien der Wirtszelle an die Außenseite der Parasitophoren Vakuole zu vermitteln (Porchet-Hennere und Nicolas, 1983; Sinai *et al.*, 1997; Sinai und Joiner, 2001). Da *T. gondii* z.B. nicht zu einer *de novo* Fettsäuresynthese befähigt ist, ermöglicht die Interaktion mit Wirtszell-Mitochondrien und Wirtszell-ER möglicherweise einen Lipidtransport zum Parasiten (Sinai *et al.*, 1997).

Anders als bei der Sekretion der MIC-Proteine handelt es sich bei der Ausschüttung der ROP-Proteine um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Prozess, der sich direkt der MIC-Sekretion anschließt (Carruthers und Sibley, 1997).

### 1.10.3. Die Dichten-Granula

Die Dichten-Granula, in der englisch-sprachigen Literatur als „dense granules“ bezeichnet (DG), sind runde, elektronendichte Organellen, die gleichmäßig über den gesamten Parasiten verteilt vorliegen. Die in den Dichten-Granula angereicherten GRA-Proteine sind in *T. gondii* den so genannten Excreted-Secreted Antigens (ESA's) zugeordnet und werden nach der Invasion vom apikalen Pol des Parasiten in die PV entlassen (Dubremetz *et al.*, 1993; Leriche und Dubremetz, 1990).

Während die Mikronemen und die Rhoptrien in der frühen Phase der Invasion des Parasiten ausgeschüttet werden, erfolgt die Sekretion der GRA-Proteine kontinuierlich über den

gesamten Entwicklungszeitraum des Parasiten in der PV. Ein Prozess, der wie die Sekretion der Mikronemen über Calcium gesteuert wird (Dubremetz *et al.*, 1993; Carruthers und Sibley, 1999; Saffer und Schwartzman, 1991). Die Sekretion verläuft dabei nicht zufällig, sondern weist Merkmale einer „regulierten Exozytose“ auf. So erfolgt die Verpackung der GRA-Proteine in elektronendichte Vesikel, die dann mit der Plasmamembran des apikalen anterioren Pols des Parasiten fusionieren. Amorphes Material, das z.B. GRA1-Proteine beinhaltet, wird in die PV ausgeschüttet (Lerliche und Dubremetz, 1990). Als weiteres Indiz einer „regulierten Exozytose“ konnte elektronenmikroskopisch die Freisetzung von membranösen Strukturen am posterioren Pol des Parasiten nachgewiesen werden (Sibley *et al.*, 1995).

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten insgesamt zwölf verschiedene GRA-Proteine identifiziert werden: GRA1-9 (Carey *et al.*, 2000, Adjogble *et al.*, 2004), Cyclophilin 18 (Karsten *et al.*, 1998, High *et al.*, 1994) sowie zwei Isoformen der 5'-Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPase) (Asai *et al.*, 1995; Bermudes *et al.*, 1994). Die genauen Funktionen der GRA-Proteine konnten jedoch in den meisten Fällen noch nicht aufgedeckt werden. Untersuchungen zufolge unterstützen sie das intrazelluläre Überleben des Parasiten, indem sie einen Nährstofftransport von der Wirtszelle sowie die Abgabe von Stoffwechselprodukten in die Wirtszelle ermöglichen (Sibley *et al.*, 1994).

Der Stoffaustausch zwischen Wirtszelle und Parasit wird durch Assoziation der PVM mit dem ER und den Mitochondrien der Wirtszelle gefördert (Sinai *et al.*, 1997). Zudem bewirken einige GRA-Proteine die Ausbildung des intravakuolären Netzwerks sowie eine Modifizierung der Vakuolenmembran (Achbarou *et al.*, 1991; Cesbron-Delauw, 1994; Mercier *et al.*, 2002). PVM-interagierende GRA-Proteine sind möglicherweise an der Ausbildung von Poren in der PVM beteiligt, durch die eine Diffusion kleiner Moleküle (1300-1900 Dalton) erfolgen kann. Die PVM von *T. gondii* fungiert als durchlässiges Sieb für kleine Substanzen, wodurch der Austausch von Aminosäuren, Zuckern und ATP gewährleistet wird (Schwab *et al.*, 1994).

Weiterhin wird den GRA-Proteinen eine Funktion als potente Immunogene in der experimentellen Toxoplasmose zugeschrieben. Durch Immunisierung mit einer Excreted-Secreted Antigen (ESA)-Präparation, welche hauptsächlich GRA-Proteine enthält, überlebten Mäuse eine ansonsten letale Infektion mit Bradyzoiten (Darcy *et al.*, 1992).

Im Gegensatz zu den GRA-Proteinen 1 bis 9 konnte die Funktion der NTPase vollständig aufgeklärt werden. Die NTPase bewirkt u.a. eine Degradierung von ATP in die jeweiligen Di- und Monophosphat-Formen (Bermudes *et al.*, 1994; Asai *et al.*, 1995) und ist essentiell für die Aufnahme von Purinen aus der Wirtszelle. Da *T. gondii* nur in der Lage ist, Pyrimidine *de novo*

zu synthetisieren, allerdings keinen *de novo* Syntheseweg für Purine besitzt, ist der Parasit auf einen ständigen Nachschub von Purinen seitens der Wirtszelle angewiesen (Schwatzman und Pfefferkorn, 1982; Bermudes *et al.*, 1994; Sibley *et al.*, 1994).

#### 1.10.4. GRA-Proteine und ihre Lokalisation

Nach der Sekretion in die Parasitophore Vakuole werden die einzelnen GRA-Proteine zu verschiedenen charakteristischen Zielstrukturen innerhalb der PV transportiert. Dabei unterscheidet man zwischen GRA-Proteinen, die löslich in der PV lokalisiert sind und solchen, die Membran-gebunden am tubulovesikulären Netzwerk oder der Membran der PV vorliegen (Charif *et al.*, 1990; Achbarou *et al.*, 1991; Mercier *et al.*, 2002). Die Sekretion der GRA-Proteine erfolgt jedoch nur im löslichen Zustand (Lecordier *et al.*, 1999).

**GRA1** (23 kD) liegt als lösliches Protein innerhalb der Parasitophoren Vakuole sowie in den Dichten-Granula vor. Zusätzlich besteht eine schwache Assoziation mit der Netzwerkstruktur im Lumen der PV (Sibley *et al.*, 1995). GRA1 beinhaltet als einziges GRA-Protein, mehrere charakteristische Calcium-bindende Domänen, die für eine Membran-Interaktion zur Verfügung stehen könnten (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989).

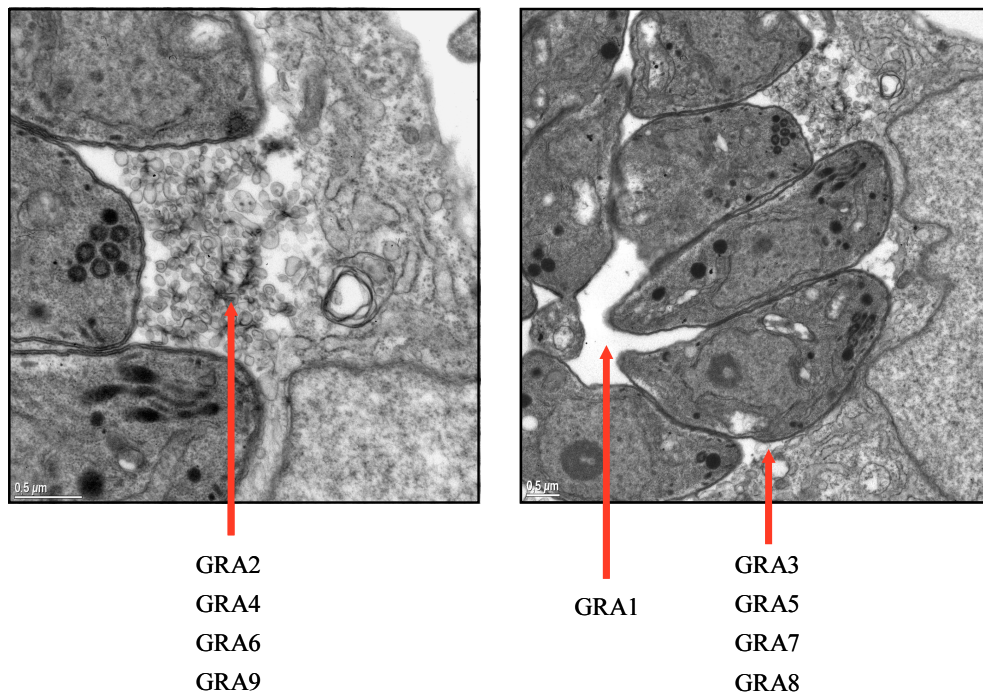
**GRA2** (28 kD) existiert als lösliche sowie als Membran-assoziierte Form innerhalb der PV und in den Dichten-Granula. Die Aminosäuresequenz von GRA2 weist keine typische hydrophobe Transmembrandomäne auf, sondern beinhaltet drei amphipatische Alpha-Helix Domänen, über die eine Bindung an Membranen ermöglicht wird (Sibley *et al.*, 1995; Mercier *et al.*, 1993; Travier *et al.*, 2007). So konnte gezeigt werden, dass GRA2 stabil über die amphiphilen Alpha-Helix-Domänen mit der membranösen Netzwerkstruktur assoziiert (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994; Sibley *et al.*, 1995) und sogar für die Ausbildung des intravakuolären Netzwerks essentiell ist (Mercier *et al.*, 1998). Weiterhin wurde GRA2 als GRA-Protein beschrieben, dessen genomische DNA-Sequenz ein Intron von einer Größe von 241 Basenpaaren enthält (Mercier *et al.*, 1993).

**GRA3** (30 kD) weist nach Sekretion als lösliches Protein primär Interaktionen mit der PVM sowie mit geringerer Präferenz mit dem membranösen Netzwerk innerhalb der PV auf (Achbarou *et al.*, 1991, Dubremetz *et al.*, 1993). Bei Analyse der Aminosäuresequenz von GRA3 konnte keine typische Transmembrandomäne identifiziert werden. GRA3 verfügt

dagegen über mehrere kurze hydrophobe Bereiche, über die eine Membranen-Interaktion ermöglicht wird (Bermudes *et al.*, 1994; Ossorio *et al.*, 1994; Robben *et al.*, 2002).

**GRA4** (40 kD) existiert in den Dichten-Granula vorwiegend als lösliches Protein. Nach Sekretion vom apikalen Pol des Parasiten wird GRA4 ins Lumen der PV entlassen und interagiert mit dem tubulovesikulären Netzwerk (Mevelec *et al.*, 1992; Labruyère *et al.*, 1999). Die Analyse der Aminosäuresequenz von GRA4 zeigt zudem die Existenz einer klassischen Transmembrandomäne auf (Mevelec *et al.*, 1992).

**GRA5** (21 kD) wird als lösliches Protein in die PV entlassen, bevor es stabil mit der Membran der Parasitophoren Vakuole (PVM) assoziiert (Lecordier *et al.*, 1993, Lecordier *et al.*, 1999). Die stabile Verbindung von GRA5 mit der PVM ist auf eine Transmembrandomäne zurückzuführen, mit der das Protein die Membran durchspannt und mit seinem Amino-Terminus ins Zytoplasma der Wirtszelle ragt (Lecordier *et al.*, 1999).



**Abb. 1.8: Lokalisation der GRA-Proteine an charakteristischen Zielstrukturen innerhalb der PV**

Links: Die Proteine GRA2, 4, 6 und 9 interagieren mit der tubulovesikulären Netzwerkstruktur. Rechts: Lokalisation von GRA1 im Lumen der Parasitophoren Vakuole (PV). Die Proteine GRA3, 5, 7 und 8 assoziieren mit der Membran der Parasitophoren Vakuole (PVM).

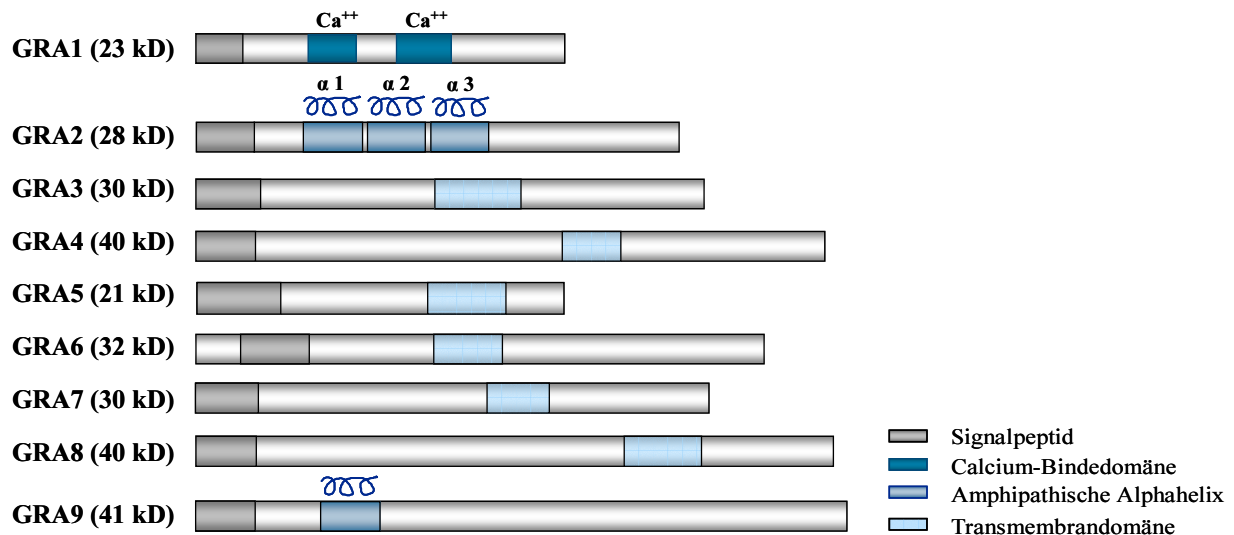
**GRA6** (32 kD) liegt in den Dichten-Granula vorwiegend als lösliches Protein vor. Nach Sekretion am apikalen Pol des Parasiten wird GRA6 zum posterioren Pol geleitet, wo es mit GRA2 an der Ausbildung bzw. Stabilisierung der Netzwerkstruktur beteiligt ist (Mercier *et al.*, 2002) sowie eindeutig mit dem intravakuolären Netzwerk interagiert (Lecordier *et al.*, 1995). Basierend auf der Netzwerklokalisation konnte für die Proteine GRA2, GRA4 und GRA6 die Ausbildung eines multimeren Proteinkomplexes nachgewiesen werden (Labruyère *et al.*, 1999). Der trimere Komplex wird durch hydrophobe Wechselwirkungen (GRA2 und GRA6) sowie durch Protein-Protein-Interaktion (GRA4) stabilisiert. Eine Analyse der Aminosäuresequenz von GRA6 zeigt zudem die Existenz einer Transmembrandomäne auf (Achbarou *et al.*, 1991; Lecordier *et al.*, 1995).

**GRA7** (30 kD) assoziiert wie GRA3 und GRA5 bevorzugt mit der Membran der PV. Die Insertion von GRA7 in die PVM erfolgt durch eine, in der Aminosäuresequenz enthaltene, hydrophobe Transmembranregion. GRA7 agiert als integrales Membranprotein. Immunfluoreszenzanalysen ermöglichten die Detektion des Proteins außerhalb der PVM (Fischer *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1998).

**GRA8** (40 kD) zeichnet sich als Prolin-reiches Protein aus. Es wird während oder kurz nach der Invasion in die PV entlassen und lagert sich an die Membran der PV an. Durch eine Aminosäuresequenzanalyse erfolgte der Nachweis einer zentralen Prolin-reichen Region aus drei hintereinander liegenden Prolin-haltigen Sequenzen, die möglicherweise an Membran-Interaktionen beteiligt sind. Zusätzlich weist GRA8 eine potentielle Transmembrandomäne am C-Terminus auf, über die ebenfalls eine Interaktion mit der PVM ermöglicht werden kann (Carey *et al.*, 2000).

**GRA9** besitzt eine Größe von 41 kD. Durch Analysen mit Gold-gelabelten GRA9-Partikeln konnte eine Interaktion mit dem tubulovesikulären Netzwerk nachgewiesen werden. Nach ersten Erkenntnissen besitzt GRA9, wie alle anderen GRA-Proteine, in seiner Aminosäuresequenz eine hydrophobe Region, die als Signalpeptid für die Sekretion des Proteins fungiert. Des Weiteren weist die Lokalisation von GRA9 innerhalb der PV auf Interaktionen mit Membranen der Parasitophoren Vakuole hin (Adjogble *et al.*, 2004). Die Analyse der Sekundärstruktur zeigt, dass GRA9, wie GRA2 eine amphiphile Alpha-Helix

beinhaltet. Weiterhin besitzt GRA9 in seiner genomischen DNA-Sequenz eine Intronstruktur mit einer Größe von 616 Basenpaaren (Nockemann *et al.*, 1998).



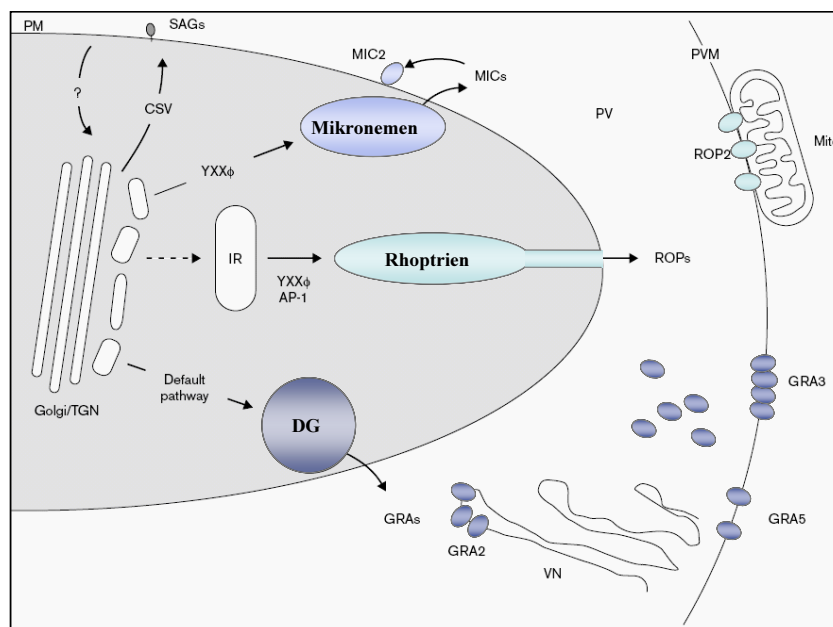
**Abb.1.9: Schematische Darstellung charakteristischer GRA-Proteindomänen von *Toxoplasma gondii***  
Vergleichende Darstellung der GRA-Proteine 1-9. Dargestellt sind die bekannten Domänen, die an einer Membranbindung beteiligt sein könnten.

### 1.11. „Targeting“ von MIC-, ROP- und GRA-Proteinen zu ihren Zielorganellen

Nach erfolgter Proteinbiosynthese werden die sekretorischen Proteine von *T. gondii* gezielt zu ihren Zielorganellen, den Mikronemen, Rhoptrien bzw. den Dichten-Granula („dense granules“) transportiert. Dieses „Targeting“ erfolgt teilweise durch einen klassischen sekretorischen Weg, ähnlich dem in eukaryotischen Zellen (Ngo *et al.*, 2000). Über eine hydrophobe Signalsequenz, die in allen sekretorischen Proteinen von *T. gondii* vorliegt, wird der Transport in das ER-Lumen vermittelt (Kaasch und Joiner, 2000). Ausgehend vom ER erfolgt der weitere Transport der Proteine über COP II-Vesikel in den Golgi-Apparat.

Der Golgi-Apparat unterteilt sich in ein Cis-Golgi-Netzwerk, über das Proteine aufgenommen werden und in ein Trans-Golgi-Netzwerk. Über das Trans-Golgi-Netzwerk erfolgt in eukaryotischen Zellen eine spezifische Sortierung der Proteine, um einen gerichteten Transport zu ermöglichen. Das gezielte Protein-„Sorting“ erfolgt dabei über spezifische „Targeting“-Signale im Protein (Allan und Balch, 1999). So wird z.B. über einen GPI-Anker der Transport

von Oberflächenproteinen an die Plasmamembran vermittelt (Karsten *et al.*, 1998). Durch Experimente mit Brefeldin A und Mikrotubuli-Inhibitoren, die einen Proteintransport durch den Golgi-Apparat unterbinden, wurde die Beteiligung des Golgi-Apparates auch beim *T. gondii*-Proteintransport nachgewiesen. Durch Blockade des Golgi-Apparates können *T. gondii*-Proteine nicht mehr in den sekretorischen Organellen detektiert werden (Stokkermans *et al.*, 1996; Karsten *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 1998; Hager *et al.*, 1999). Zusätzlich zum Signalpeptid enthalten die ROP- sowie MIC-Proteine spezifische „Targeting“-Signale für den gerichteten Transport in die Rhoptrien (Bradley und Boothroyd, 2001; Striepen *et al.*, 2001) sowie in die Mikronemen. (Carruthers *et al.*, 2000; Garcia-Reguet *et al.*, 2000; Brecht *et al.*, 2001). Für GRA-Proteine konnten dagegen keine „Targeting“-Signale identifiziert werden, über die der Transport in die Dichten-Granula gesteuert wird (Karsten *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 1998). Untersuchungen zeigen, dass *T. gondii*-Proteine (MIC, ROP) bei einem Verlust ihrer spezifischen „Targeting“-Signale, in die Dichten-Granula transportiert werden (Striepen *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 2001; Reiss *et al.*, 2001). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die GRA-Proteine aufgrund ihres fehlenden „Targeting“-Signals gezielt in die Dichten-Granula gelenkt werden.



**Abb. 1.10: „Targeting“ der sekretorischen *Toxoplasma gondii*-Proteine zu ihren Zielorganellen**

TGN: Trans-Golgi-Netzwerk; PV: Parasitophore Vakuole; PVM: Membran der Parasitophoren Vakuole; Mito: Mitochondrien; DG: Dichte-Granula; MICs: Mikronemen-Proteine; ROPs: Rhoptrien-Proteine; YXX-Motive: protein bearing transmembran domain, VN: vakuoläres Netzwerk (modifiziert nach Kaasch und Joiner, 2000).



### 1.12. *Toxoplasma gondii*: Zytoskelett und Fortbewegung

Das Zytoskelett von *T. gondii* besteht aus gerüstartig angeordneten filamentären Strukturen wie Mikrotubuli, Aktin und Myosin, die für die polarisierte Sekretion des Parasiten sowie dessen Fortbewegung verantwortlich sind (Morrisette und Sibley, 2002; Morrisette und Sibley, 2002 b). In Ermangelung an Zilien oder Flagellen bewegen sich *T. gondii*-Parasiten, wie auch die übrigen Vertreter der Apikomplexa, durch eine gleitende Bewegung auf festen Oberflächen voran (Sibley *et al.*, 1998). Diese gleitende Fortbewegung, auch „gliding motility“ genannt, ist energieabhängig und wird überwiegend vom Zytoskelett ermöglicht (Frixione *et al.*, 1996; Nichols und Chiappino, 1987).

Ohne auffällige Konformationsänderung wird der Parasit mit Hilfe des so genannten parasitären Aktin-Myosin-Motors vorangetrieben (Dobrowolski *et al.*, 1997; Ménard, 2001). Für die Aktivität des Aktin-Myosin-Motors sind Transmembranproteine erforderlich, die den Motor mit einem außerhalb der Zelle liegenden Liganden verbinden (Morrisette und Sibley, 2002). Zu diesen Proteinen zählen die Vertreter der Thrombospondin-Familie (TRAP-Familie). Diese Mikronemenproteine wie MIC2 zeichnen sich durch eine putative Transmembrandomäne aus, mit der sie an weit verbreitete Oberflächenmoleküle anbinden können. Untersuchungen zufolge werden die MIC-Proteine nach der Sekretion gerichtet vom apikalen zum posterioren Pol des Parasiten transportiert, bevor sie von der Oberfläche des Parasiten abgespalten werden (Sibley, 2004). Durch diese gerichtete Bewegung der MIC-Proteine auf der Parasitenoberfläche wird der Parasit automatisch um Strecken zwischen 1-10 µm/s voran geschoben (King, 1988; Carruthers *et al.*, 2000; Huynh *et al.*, 2003).

Das Zytoskelett ermöglicht ebenfalls die Ausführung einer helikalen Rotationsbewegung, durch die eine aktive Invasion in die Wirtszelle ermöglicht wird (Dubremetz, 1998; Dobrowski und Sibley, 1996).

### 1.13. Genetik von *Toxoplasma gondii*

Das nukleäre Genom von *T. gondii* umfasst ca. 87 Mb (Cornelissen *et al.*, 1984) verteilt auf 11 Chromosomen, die eine Größe zwischen 2 Mb und mehr als 10 Mb besitzen. (Sibley und Boothroyd, 1992; Sibley *et al.*, 1992). Basierend auf cytophotometrischen DNA-Messungen verschiedener *T. gondii*-Stadien konnte ermittelt werden, dass nur die Oozyste (Zygote) im

diploiden Zustand existiert, alle weiteren Zystenstadien (Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoiten) kommen dagegen lediglich im haploiden Zustand vor.

In den Mitochondrien verfügt *T. gondii* zudem über ein Multikopien-Element von 6 bis 7 kb, das für stark fragmentierte rRNA sowie Proteine der Atmungskette kodiert (Cytochrom b, Cytochrom c, Oxidase) (Vaidya *et al.*, 1989; Feagin, 1992; Feagin 2000). Weiterhin besitzt *T. gondii* ein episomales 35 kb Plastid-ähnliches Genom in einem chloroplastenartigen Organell, das als Apikoplast bezeichnet wird. Der Apikoplast ist als typisches Merkmal bei den meisten Vertretern der Apikomplexa zu finden (Köhler *et al.*, 1997; Ajioka *et al.*, 2001). Er ist ein durch sekundäre Endosymbiose erworbenes Organell, das sich durch vier Membranen vom umgebenen Zytoplasma des Parasiten abtrennt. Das Genom des Apikoplasten ist homolog zu dem aus Plastiden photosynthetischer Organismen und für eine Synthese von aromatischen Aminosäuren sowie Fettsäuren und Isoprenoiden verantwortlich (Köhler *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1998; Kim und Weiss 2004). Zu einer Photosynthese ist der Apikoplast jedoch nicht mehr befähigt (Fichera und Roos, 1997).

In Bezug auf die Herkunft des Apikoplasten konnte nachgewiesen werden, dass *T. gondii* und *Plasmodium falciparum* in der Lage sind, das in Chloroplasten vorkommende Monogalactosyldiacylglycerol sowie das Digalactosyl-diacylglycerol zu synthetisieren. Weiterhin weisen Epitope von Apikoplasten-Proteinen eine Verwandtschaft zu Proteinen von Chloroplasten aus Landpflanzen auf (Maréchal *et al.*, 2002). In dem Genom des Apikoplasten konnten, zusätzlich zur Enolase, Glukose-6-Phosphat-Isomerase und Hsp60 (Soldati, 1999) und eine Vielzahl an rRNA-Genen identifiziert werden (Kim und Weiss, 2004). Viele Proteine werden jedoch nicht im Apikoplasten direkt kodiert, sondern müssen aus der Wirtszelle importiert werden (Waller *et al.*, 1998; Gleeson, 2000). Wie auch bei anderen extrachromosomalen Genomen fand im Apikoplasten zudem im Verlauf der Evolution ein Gentransfer vom Plastid in den Nukleus statt. Eine Vielzahl an Genen, die im Nukleus kodiert werden, findet daher ihren Ursprung im Vorläufer des Apikoplasten.

Die Expression von Genen erfolgt in *T. gondii* transkriptional (Soldati und Boothroyd, 1995; Mercier *et al.*, 1996; Nakaar *et al.*, 1998). Durch die Analyse der Promotorstruktur konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* nicht über cis-wirkende Motive wie die TATA-Box oder das SP1-Motiv verfügt, wie sie bei eukaryotischen Zellen vorkommen (Dyran *et al.*, 1985; Mitchell und Tjian, 1989). Die Funktion der cis-wirkenden Motive wird mit großer Wahrscheinlichkeit von einem hoch konservierten Heptanukleotidmotiv (T/AGAGACG) übernommen, dass in der 5'-untranslatierten Region (UTR) von *T. gondii*-Genen identifiziert

werden konnte (Soldati und Boothroyd, 1995; Mercier *et al.*, 1996; Nakaar *et al.*, 1998). Das Heptanukleotidmotiv weist in den verschiedenen GRA-Genen von *T. gondii* eine starke Variabilität in der Anzahl, der Position sowie der Orientierung auf (Mercier *et al.*, 1996). Es kann direkt oder invertiert in der Sequenz vorliegen. In der Sequenz von GRA5 konnten zwei gleich orientierte Heptanukleotidmotive nachgewiesen werden, wohingegen GRA1 sechs Motive mit unterschiedlicher Orientierung aufweist. Bei den Genen der GRA-Proteine handelt es sich um single-copy Gene. Ausgenommen von GRA2 und GRA9 verfügen sie über keinerlei Intron-Strukturen.

Durch Klonierung und Sequenzierung von *T. gondii*-cDNA-Abschnitten konnte über Jahre eine EST-Datenbank erstellt werden (Expressed Sequence Tag), in der mehr als 60.000 ESTs verfügbar vorliegen (Ajioka *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003). Durch einen Abgleich der bestehenden Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) mit Datenbanken anderer Organismen erfolgte die Identifizierung einer Vielzahl von Proteinen. Unter anderem wurden Stadien-spezifisch exprimierte Gene durch einen Vergleich der ESTs verschiedener Stadien, aufgedeckt. Jedoch gehören 50 % der existierenden ESTs zu Genen, denen bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (Ajioka, 1998).

#### **1.14. *Toxoplasma gondii* im Labor**

Aufgrund seiner vergleichsweise guten Zugänglichkeit für genetische Analysen sowie der einfachen Kultivierbarkeit im Labor hat sich *T. gondii* als Modellorganismus der intrazellulären Parasiten etabliert (Sinai *et al.*, 1997). So erfolgte eine Analyse der biologischen Funktion von Proteinen, die in anderen Vertretern der Apikomplexa nur schwach exprimiert wurden. Durch Anbindung verschiedener Epitope, wie GFP, c-myc oder HA an die Proteine von *T. gondii* ist eine detaillierte Analyse des Proteintransports sowie der Organellen-Biosynthese möglich. Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Markerproteinen kann die genaue Lokalisation der *T. gondii*-Proteine im Rahmen der Infektion bestimmt werden. Auf Basis dieser Analysemethode ist u.a. die Detektion  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierender Proteine in der Zellkultur und auch im Gehirn chronisch infizierter Mäuse möglich (Seeber und Boothroyd, 1996; Dao *et al.*, 2002).

Da es sich bei *T. gondii*-Tachyzoiten um ein haploides Genom handelt, erfolgt eine Mutation oder Eliminierung im Gen stark vereinfacht. Aufgrund des haploiden Genoms können Sequenzveränderungen oder Deletionen jedoch nur in nicht-essentiellen Genen stattfinden.

*T. gondii* ist zudem das erste obligat intrazelluläre Protozoon, das mit exogener DNA transformiert wurde (Donald und Roos, 1993; Soldati und Bootroyd, 1993). Um eine erfolgreiche Expression zu gewährleisten, sind spezifische *T. gondii*-Promotoren essentiell, da Promotoren höherer Eukaryoten und Viren in *T. gondii* nicht funktionsfähig sind.

Um Fremd-DNA in den Parasiten einzubringen, steht die Methode der transienten oder der stabilen Transfektion zur Verfügung (Soldati, 1996). Bei der transienten Transfektion verbleibt die eingebrachte Plasmid-DNA extrachromosomal und geht mit fortlaufender Teilung der Parasiten wieder verloren.

Im Rahmen der stabilen Transfektion wird durch nicht-homologe Rekombination linearisierte Plasmid-DNA ungerichtet ins *T. gondii*-Genom integriert. Durch Vorgabe einer definierten Größe der flankierenden Regionen kann jedoch die Integration der Plasmid-DNA „gezielt“ durchgeführt werden (Donald und Roos, 1994). In diesem Fall spricht man von einer homologen Rekombination.

Für eine Selektion positiver Transformanten stehen effiziente Selektionsmarker und Reportersysteme zur Verfügung, die jedoch auch geringfügig zu einer Schädigung der Wirtszelle führen können. Zu den Selektionsmarkern zählen u.a. die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (Kim *et al.*, 1993), das Bleomycin-Resistenzgen (*ble*), das Tryptophan-Gen (*trp*) (Sibley *et al.*, 1994; Messina *et al.*, 1995; Soldati *et al.*, 1995; Donald *et al.*, 1996), die Dihydrofolat-Reduktase-Thymidilat-Synthase (DHFR-TS) (Donald und Roos, 1993) und das Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen (*hvgprt*) (Donald *et al.*, 1996). Eine Selektion mit Chloramphenicol greift in *T. gondii* nicht sofort, sondern verläuft über einen längeren Zeitraum von zwanzig bis fünfundzwanzig Teilungen. In der Zellkultur ist eine dreimalige Lyse des Wirtszellrasens zu verfolgen, bevor eine deutlich sichtbare Selektion der Toxoplasmen erfolgt (Kim *et al.*, 1993).

### 1.15. Zielsetzung der Arbeit

Bei der reaktivierten Toxoplasmose handelt es sich um eine der häufigsten opportunistischen Infektionen des Zentralnervensystems bei immunsupprimierten Patienten. Zudem gewinnt *T. gondii* als Verursacher der Toxoplasmose bei Neugeborenen weiter an medizinisch-klinischer Bedeutung. Die antiparasitäre Therapie greift ungezielt in den Folsäurestoffwechsel, bzw. die Proteinbiosynthese ein. Dabei ist bekannt, dass komplexe, immunologische Vorgänge den Verlauf der akuten und der chronischen Erkrankung determinieren, und Stadienwechsel der

Parasiten bei der Krankheitsexazerbation beteiligt sind. Die Infektion kernhaltiger Zellen und die daraus resultierenden Läsionen im Gewebe sind Auswirkungen komplexer Pathogenitäts-Mechanismen, an denen die sekretorischen Organellen, die Mikronemen, Rhoptrien und die Dichten-Granula essentiell beteiligt sind (Lovett *et al.*, 2002; Joiner und Roos, 2002, Sinai und Joiner, 2001; Achbarou *et al.*, 1991; Mercier *et al.*, 2002).

Die sekretorischen Proteine, und darunter insbesondere die GRA-Proteine wurden als immundominante Antigene von *T. gondii* beschrieben. Die exakte Funktion der einzelnen GRA-Proteine konnte jedoch noch nicht identifiziert werden (Sibley *et al.*, 1994).

In unserem Labor wurde das Protein GRA9 als neuer, immundominanter Vertreter der GRA-Proteinfamilie charakterisiert. Nach Sekretion in die Parasitophore Vakuole wird GRA9 zum tubulovesikulären Netzwerk und zur Membran der Parasitophoren Vakuole transportiert und geht dort Interaktionen mit den membranösen Strukturen ein, die für seine Funktion bedeutsam sein könnten.

Hier setzt die vorliegende Arbeit ein, deren Ziel es ist, Domänen des GRA9-Proteins zu definieren, die für eine Vermittlung der Membran-Interaktion innerhalb der PV essentiell sein könnten. Für diese Analysen sollten Deletionsmutanten von GRA9 hergestellt werden, denen diejenigen Sequenzen fehlen, die in anderen GRA-Proteinen für Membran-Interaktionen u.a. verantwortlich sind. Durch Markierung dieser mutierten GRA9-Proteine mit dem myc-Epitop kann das „Targeting“- und Bindungsverhalten dieser Deletionsproteine sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in Western-Blot-Analysen detailliert untersucht werden. Durch Kombination dieser beiden Methoden kann nicht nur die Lokalisation der modifizierten GRA9-Proteine analysiert werden, sondern es können auch Aussagen über die Stärke der Interaktion erhalten werden.

In der neueren Literatur werden sowohl für Mikronemenproteine als auch für GRA-Proteine multimolekulare Proteinkomplexe beschrieben, die sowohl das „Targeting“ der Proteine als auch deren Membran-Bindung beeinflussen. Daher lag ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, festzustellen ob auch GRA9 mit anderen sekretorischen Proteinen Interaktionen innerhalb der Parasitophoren Vakuole eingeht. Dazu wurden initial Doppel-Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Durch Co-Lokalisationsexperimente sollten potentielle GRA9-Interaktionspartner identifiziert, und später mit Co-Immunpräzipitationsanalysen verifiziert werden. Im Rahmen weiterer Feinanalysen sollten, ebenfalls durch Konstruktion von Deletionsmutanten, Domänen von GRA9 identifiziert werden, die für die Protein-Protein-Interaktion mit anderen Proteinen *in vivo* essentiell sind.

---

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sollen dazu dienen, neue Erkenntnisse über die Funktion der GRA-Proteine zu erhalten, deren genaue Funktion im Lebenszyklus von *T. gondii* bisher noch nicht vollständig definiert ist. In der Literatur wird diskutiert, dass GRA-Proteine das intrazelluläre Überleben des Parasiten unterstützen, indem sie einen Nährstofftransport von der Wirtszelle in die Parasitophore Vakuole ermöglichen (Sibley *et al.*, 1994). Vor diesem Hintergrund ist die Bedeutung der Membran-Interaktion des GRA9-Proteins in Bezug auf einen spezifischen Stoffaustausch zwischen Wirtszelle und Parasit zu diskutieren.

## 2. Material

### 2.1. Allgemeines

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad „pro analysi“. Zum Ansetzen von Medien und Lösungen wurde Reinstwasser verwendet (Hausanlage Millipore GmbH, Schwalbach).

### 2.2. Plasmide

**Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide**

| Plasmidbezeichnung              | Bezugsquelle                                             |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
| pGEM-T easy :                   | Promega, (Madison, USA)                                  |
| pTub-myc:                       | freundliche Gabe von Boris Striepen (Athens, USA)        |
| pTub-GRA9-myc:                  | in dieser Arbeit hergestellt                             |
| pGEM-GRA9-myc:                  | in dieser Arbeit hergestellt                             |
| pGEM-GRA9 $\Delta$ AH-myc:      | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pGEM-GRA9 $\Delta$ HH1-myc:     | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pGEM-GRA9 $\Delta$ HH2-myc:     | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pGEM-GRA9 $\Delta$ PEST-myc:    | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pTub-GRA9 $\Delta$ AH-myc:      | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pTub-GRA9 $\Delta$ HH1-myc:     | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pTub-GRA9 $\Delta$ HH2-myc:     | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pTub-GRA9 $\Delta$ PEST-myc:    | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pTub-GRA9 $\Delta$ 202-318-myc: | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pTub-GRA9 $\Delta$ 253-318-myc: | in dieser Arbeit hergesellt                              |
| pTub-kompGRA5:                  | freundliche Gabe von Corinne Mercier (Lille, Frankreich) |
| pTub- $\Delta$ GRA5:            | freundliche Gabe von Corinne Mercier (Lille, Frankreich) |

### 2.3. Desoxyoligonukleotide

Die aufgelisteten Desoxyoligonukleotide („Primer“) wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Lagerung der Primer erfolgte bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabelle 2.2: Primer zur Klonierung und Mutagenese**

| Primerbezeichnung                          | Sequenz                                                                          |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <i>AvrII</i> -GRA9-mycrev:                 | 5'-TAC CTA GGC AGG TCC TCC TCG GAG ATG AGC<br>TTC TGC TCG AGT CCT CGG TC-3'      |
| <i>BglII</i> -GRA9-mycfor:                 | 5'-ATA GAT CTC CTT TTT CGA CAA AAT GCG GTC<br>ACT CAA GTC AAT CGT CGT GCC CCT-3' |
| GRA9 $\Delta$ AH-rev:                      | 5'-CGA GAA ATC TCC GAA TCC GGA A-3'                                              |
| GRA9 $\Delta$ AH-for:                      | 5'-CGA GGT GTG GAT GGA TTT GGC CCG T-3'                                          |
| GRA9 $\Delta$ HH1-rev:                     | 5'-GCA TTG CGG GTC CAC AGA CAT CAG CT-3'                                         |
| GRA9 $\Delta$ HH1-for:                     | 5'-TGG ACA GAC AAC ACT CAC ACC GCA A-3'                                          |
| GRA9 $\Delta$ HH2-rev:                     | 5'-GTT GTC TGG CAG ATA CCC CTC CTT GA-3'                                         |
| GRA9 $\Delta$ HH2-for:                     | 5'-TTC TCC CGG ACC CAG ATG TGC CTG GT-3'                                         |
| GRA9 $\Delta$ PEST-rev:                    | 5'-CTC CTC GAG TTC GAC CTC TTG GCC CT-3'                                         |
| GRA9 $\Delta$ PEST-for:                    | 5'-CCC CGA CTC TCG CAG GAA GAC CGA GGA-3'                                        |
| <i>AvrII</i> -GRA9 $\Delta$ 202-318mycrev: | 5'-TAC CTA GGC AGG TCC TCC TCG GAG ATG AGC<br>TTC TGC TCG CAT TGC GGG TCC ACA-3' |
| <i>AvrII</i> -GRA9 $\Delta$ 253-318mycrev: | 5'-TAC CTA GGC AGG TCC TCC TCG GAG ATG AGC<br>TTC TGC TCG TTG TCT GGC AGA TAC-3' |



## 2.4. Antikörper

**Tabelle 2.3: Primäre Antikörper**

| Primäre Antikörper                | Quelle                                     | Einsatz im Western-Blot |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|
| mAK Maus-anti-myc:                | Roche Diagnostics (Mannheim)               | 1:500                   |
| Kaninchen-anti-GRA9-Serum:        | Eurogentec (Belgien)                       | 1:1000                  |
| mAK Maus-anti- <i>T.g.</i> -GRA1: | M-F. Cesbron-Delauw (Grenoble, Frankreich) | 1:1000                  |
| mAK-Maus-anti- <i>T.g.</i> -GRA2: | M-F. Cesbron-Delauw (Grenoble, Frankreich) | 1:1000                  |
| mAK-Maus-anti- <i>T.g.</i> -GRA3: | M-F. Cesbron-Delauw (Grenoble, Frankreich) | 1:1000                  |
| mAK-Maus-anti- <i>T.g.</i> -GRA5: | M-F. Cesbron-Delauw (Grenoble, Frankreich) | 1:1000                  |

**Tabelle 2.4: Sekundäre Antikörper**

| Sekundäre Antikörper                  | Markierung/Spezies                                                    | Quelle/Einsatz                                               |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| anti-Kaninchen IgG/PO:                | polyklonal aus Ziege<br>gegen Kaninchen-IgG,<br>Peroxidase-konjugiert | Jackson Immuno Research<br>1:7500 im WB                      |
| anti-Maus IgG/PO:                     | monoklonal, aus Ziege<br>gegen Maus-IgG,<br>Peroxidase-konjugiert     | Jackson Immuno Research<br>1:7500 im WB                      |
| Cy <sup>2</sup> / (Cy <sup>3</sup> ): | affinitätsgereinigt, aus Ziege<br>gegen Maus-IgG/IgM                  | Jackson ImmunoResearch,<br>(Suffolk, UK)<br>1:500 in der IFA |
| Cy <sup>3</sup> / (Cy <sup>2</sup> ): | affinitätsgereinigt, aus Ziege<br>gegen Kaninchen-IgG/IgM             | Jackson ImmunoResearch,<br>(Suffolk, UK)<br>1:500 in der IFA |

## 2.5. Restriktionsenzyme für die Molekularbiologie

Tabelle 2.5: Verwendete Restriktionsenzyme

| Restriktionsenzyme             | Bezugsquelle                            |
|--------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>AvrII</i> :                 | NEB (Beverly, USA) 10 U/ $\mu$ l        |
| <i>BglII</i> :                 | NEB (Beverly, USA) 10 U/ $\mu$ l        |
| <i>BamHI</i> :                 | Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/ $\mu$ l |
| <i>BanII</i> :                 | Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/ $\mu$ l |
| <i>ClaI</i> :                  | NEB (Beverly, USA) 10 U/ $\mu$ l        |
| <i>EcoRI</i> :                 | Promega (Madison, USA) 10 U/ $\mu$ l    |
| <i>EheI</i> ( <i>NarI</i> ):   | Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/ $\mu$ l |
| <i>NruI</i> ( <i>Bsp68I</i> ): | Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/ $\mu$ l |
| <i>NsiI</i> :                  | NEB (Beverly, USA) 10 U/ $\mu$ l        |
| <i>PstI</i> :                  | Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/ $\mu$ l |
| <i>PvuII</i> :                 | NEB (Beverly, USA) 10 U/ $\mu$ l        |
| <i>XhoI</i> :                  | Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/ $\mu$ l |
| <i>XmnI</i> ( <i>PnmI</i> ):   | Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/ $\mu$ l |

## 2.6. Sonstige Enzyme

Tabelle 2.6: Sonstige Enzyme für die Molekularbiologie

| Enzym                                | Bezugsquelle                              |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|
| DNase I:                             | Roche Diagnostics (Mannheim)              |
| Expand-High-Fidelity-DNA-Polymerase: | Roche Diagnostics (Mannheim)              |
| Proteinase K:                        | Roche Diagnostics (Mannheim)              |
| RNaseA:                              | Roche Diagnostics (Mannheim)              |
| T4-DNA-Ligase:                       | Promega (Mannheim) 60 U/ $\mu$ l          |
| Taq-Polymerase:                      | Roche Diagnostics (Mannheim) 5 U/ $\mu$ l |
| Shrimp alkalische Phosphatase (SAP): | Roche Diagnostics (Mannheim)              |

## 2.7. Größenstandards

### 2.7.1. Größenstandards für Nukleinsäuren

Für die Größenbestimmung getrennter DNA-Fragmente in Agarosegelen wurde die „1-kb-DNA-Leiter“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) als Standard eingesetzt. Die Lagerung der „1-kb-DNA-Leiter“ erfolgte bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Fragmentgrößen der „1-kb-DNA-Leiter“ [bp]:

10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250

### 2.7.2. Größenstandards für Proteine

Zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteingrößenstandards der Firma Invitrogen (Karlsruhe) herangezogen. In der folgenden Tabelle sind die molekularen Massen der SeeBlue Plus2 Pre-stained Standardproteine aufgelistet.

**Tabelle 2.7: Molekulargewichte der Proteingrößenstandards von SeeBlue Plus2**

| Proteine des Größenstandards | Tris-Glycine [kDa] | NP MOPS [kDa] |
|------------------------------|--------------------|---------------|
| Myosin                       | 250                | 191           |
| Phosphorylase                | 148                | 97            |
| BSA                          | 98                 | 64            |
| Glutamic Dehydrogenase       | 64                 | 51            |
| Alkohol Dehydrogenase        | 50                 | 39            |
| Carbonic Anhydrase           | 36                 | 28            |
| Myoglobin Red                | 22                 | 19            |
| Lysozyme                     | 16                 | 14            |
| Aprotinin                    | 6                  | n/a           |
| Insulin, B Chain             | 4                  | n/a           |

## 2.8. Medien und Puffer

Alle verwendeten Puffer und Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt. Puffer und Lösungen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten sowie für die Zellkultur wurden für 60 min bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert.

|                                                                  |                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Iscoe's modified Dulbecco's medium:<br>(Lonza Walkersville, USA) | IMDM<br>25 mM HEPES<br>+ L-Glutamin                                                                                            |
| Zellkultur-Medium:                                               | 500 ml IMDM<br>10 % (v/v) Fötales Kälberserum<br>25 µg/ml Gentamycin                                                           |
| TBE-Puffer:                                                      | 89 mM Tris-HCl, pH 7<br>89 mM Borsäure<br>2,5 mM EDTA                                                                          |
| LB (Luria-Bertani)-Medium:                                       | 10 g/l Bacto-Trypton<br>5 g/l Hefeextrakt<br>10 g/l NaCl<br>ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O<br>pH 7 mit 5 N NaOH; autoklaviert |
| LB-Platten:                                                      | LB-Medium<br>1,2 % Bacto-Agar<br>100 µg/ml Ampicillin (nach Abkühlung)                                                         |
| dNTP-Mix:                                                        | 1 mM dATP<br>1 mM dCTP<br>1 mM dTTP<br>1 mM dGTP                                                                               |

---

|                                  |                                                                                                                            |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS (Phosphate-buffered saline): | 13,7 mM NaCl<br>2,7 mM KCl<br>80,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>pH 7,4 |
| TE-Puffer:                       | 10 mM Tris-HCl, pH 8<br>1 mM EDTA                                                                                          |
| Laufpuffer (Western-Blot):       | 50 mM MOPS<br>50 mM Tris-Base<br>0,1 % (w/v) SDS<br>1 mM EDTA<br>pH 7,7                                                    |

## 2.9. Feinchemikalien

|                                                          |                           |
|----------------------------------------------------------|---------------------------|
| 4'6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochloridhydrat (DAPI): | Boehringer (Mannheim)     |
| Aceton:                                                  | Merck (Darmstadt)         |
| Acrylamid:                                               | Serva (Heidelberg)        |
| Agarose:                                                 | Biozym (Oldendorf)        |
| Ammoniumchlorid:                                         | Merck (Darmstadt)         |
| Ammoniumoxalat:                                          | Sigma (Taufkirchen)       |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS):                            | Sigma (Taufkirchen)       |
| Ampicillin:                                              | Boehringer (Mannheim)     |
| Bovine Serum Albumine, cell culture tested:              | Sigma (Taufkirchen)       |
| Bromphenolblau:                                          | Merck (Darmstadt)         |
| CaCl <sub>2</sub> :                                      | Merck (Darmstadt)         |
| Chloramphenicol:                                         | Sigma (Taufkirchen)       |
| Coomassie Brilliant Blue R250:                           | Serva (Heidelberg)        |
| Desoxynukleotide (dNTPs):                                | Fermentas (St. Leon-Roth) |
| Diethylether:                                            | Merck (Darmstadt)         |

---

|                                                        |                         |
|--------------------------------------------------------|-------------------------|
| Diethylpyrocarbonat (DEPC):                            | Sigma (Taufkirchen)     |
| Dimethylsulfoxid (DMSO):                               | Sigma (Taufkirchen)     |
| Dithiothreitol (DTT):                                  | Invitrogen (Karlsruhe)  |
| Ethanol 97 %:                                          | Merck (Darmstadt)       |
| Ethidiumbromid:                                        | Merck (Darmstadt)       |
| Ethylendiaminetetraacetat (EDTA), cell culture tested: | Riedel-de Haen (Seelze) |
| Fluoromount-G SBA:                                     | Birmingham (USA)        |
| Formaldehyd:                                           | Merck (Darmstadt)       |
| Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert :          | PAN-Biotech (Aidenbach) |
| Glutamin (200 mM):                                     | BioWhittaker (Belgien)  |
| Glutathion:                                            | Merck (Darmstadt)       |
| Glycerin:                                              | Merck (Darmstadt)       |
| Glycin:                                                | Merck (Darmstadt)       |
| Harnstoff:                                             | Merck (Darmstadt)       |
| HEPES:                                                 | Invitrogen (Karlsruhe)  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :                      | Merck (Darmstadt)       |
| Kaliumchlorid:                                         | Merck (Darmstadt)       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :                      | Merck (Darmstadt)       |
| LB-Agar:                                               | Roth (Karlsruhe)        |
| LB-Medium:                                             | Roth (Karlsruhe)        |
| Magnesiumchlorid:                                      | Merck (Darmstadt)       |
| Milchpulver:                                           | Oxois (Hampshire, UK)   |
| N-(1-Naphthyl)ethylendiamin:                           | Sigma (Taufkirchen)     |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED):            | Sigma (Taufkirchen)     |
| NaOH:                                                  | Merck (Darmstadt)       |
| Natriumacetat:                                         | Merck (Darmstadt)       |
| Natriumazid:                                           | Merck (Darmstadt)       |
| Natriumcarbonat:                                       | Merck (Darmstadt)       |
| Natriumchlorid:                                        | Merck (Darmstadt)       |
| Natriumcitrat:                                         | Merck (Darmstadt)       |
| Natriumdodecylsulfat (SDS):                            | Schuchart (Hohenbrunn)  |
| Natriumthiosulfat:                                     | Merck (Darmstadt)       |
| n-Butanol:                                             | Merck (Darmstadt)       |

---

|                                          |                     |
|------------------------------------------|---------------------|
| Paraformaldehyd:                         | Merck (Darmstadt)   |
| Phenol/Chloroform:                       | Roth (Karlsruhe)    |
| Phosphorsäure 85 %:                      | Merck (Darmstadt)   |
| Salzsäure:                               | Roth (Karlsruhe)    |
| Schwefelsäure:                           | Merck (Darmstadt)   |
| Silbernitrat:                            | Merck (Darmstadt)   |
| Thioglykolat:                            | Sigma (Taufkirchen) |
| Thioharnstoff:                           | Merck (Darmstadt)   |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris): | Merck (Darmstadt)   |
| Triton-X-100:                            | Merck (Darmstadt)   |
| Triton-X-114:                            | Merck (Darmstadt)   |
| Trypanblau:                              | Sigma (Taufkirchen) |
| Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % w/v):        | Biochrom (Berlin)   |
| Tween-20:                                | Merck (Darmstadt)   |
| Wasserstoffperoxid:                      | Merck (Darmstadt)   |
| Xylencyanol:                             | Merck (Darmstadt)   |

## 2.10. Sonstige Materialien und Geräte

|                                     |                                             |
|-------------------------------------|---------------------------------------------|
| Blottingkammer:                     | Semidry, Bio-Rad (München)                  |
| Brutschränke:                       | Heraeus (Hanau), B5060 EK/CO <sub>2</sub>   |
| Elektrophoresekammer:               | AGS (Heidelberg) versch. Modelle            |
| Fluoreszenzmikroskop:               | Zeiss (Köln), Photomikroskop II             |
| Geltrockner:                        | Amersham Biosciences (Freiburg)             |
| Kippschüttler:                      | Duomax 1030, Heidolph (Nürnberg)            |
| Kodak X-OMAT, AR Film, XAR-5 Kodak: | Rochester (USA)                             |
| Nitrozellulosemembran „Protran“:    | Schleicher & Schüll (Dassel) (0,45 µm)      |
| pH-Meßgerät:                        | φ 32 pH-Meter, Beckman-Coulter<br>(München) |
| Pipetten:                           | Labsystems (München), Finnpiquette          |
| Quarzküvetten:                      | Hellma, 100 µl (Jena)                       |
| Röntgenfilmkammer:                  | REGO (Haan)                                 |

---

|                                     |                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Filme Hyperfilm <sup>TM</sup> -ECL: | GE Healthcare (München)                                                                                                                                                                                            |
| Spannungsgeber:                     | Electrophoresis constant Power Supply<br>EPS 500/400, Amersham Biosciences<br>(Freiburg)                                                                                                                           |
| Spektralphotometer:                 | DU 640, Beckman-Coulter (München)                                                                                                                                                                                  |
| Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A):   | Flow Laboratories (Meckenheim)                                                                                                                                                                                     |
| Thermocycler:                       | Perkin Elmer, Thermal Cycler 480<br>Biometra (Göttingen), UNO Thermoblock                                                                                                                                          |
| Ultraschallgerät:                   | Modell 450/250 Sonifier, Branson über G.<br>Heinemann Ultraschall und Labortechnik<br>(Schwäbisch Gmünd)                                                                                                           |
| Vortexer:                           | Bender & Hobein AG (Zürich, CH)                                                                                                                                                                                    |
| Wasserbad:                          | GFL (Burgwedel)                                                                                                                                                                                                    |
| Zentrifugen:                        | Beckman J2-21 mit JA14 und JA20<br>Rotoren (München),<br>Heraeus Megafuge 1.0 R mit<br>Ausschwingrotor (Hanau),<br>Ultrazentrifuge Beckman Optima L60<br>Rotor SW41Ti (München),<br>Heraeus Biofuge fresco (Hanau) |

## 2.11. Plastikwaren und sonstige Einwegartikel

|                                           |                                  |
|-------------------------------------------|----------------------------------|
| Deckgläschen, Glas, ø 13 mm:              | Hecht-Assistent (Sondheim)       |
| Einmalspitzen:                            | Polylab (Seoul, Korea)           |
| Cryo-Tubes:                               | Nunc GmbH (Wiesbaden)            |
| Reaktionsgefäße, 0.5-2,0 ml:              | Eppendorff (Hamburg)             |
| Einmalspritzen, 1 ml:                     | Polylab (Seoul, Korea)           |
| Einmalspritzen, 5-20 ml:                  | Polylab (Seoul, Korea)           |
| Einwegküvetten:                           | Sarstedt (Nümbrecht)             |
| Filterpapier Whatman 3MM:                 | VWR (Darmstadt)                  |
| Kanülen; Microlance, verschiedene Größen: | BD Becton Dickinson (Heidelberg) |



---

|                                              |                                  |
|----------------------------------------------|----------------------------------|
| 96-well Mikrotiterplatte:                    | Greiner (Frickenhausen)          |
| Petrischalen:                                | Greiner (Frickenhausen)          |
| Zellkulturschalen:                           | BD Becton Dickinson (Heidelberg) |
| Säulen Polypropylen, 1 ml:                   | Qiagen (Hilden)                  |
| Sterilfilter:                                | Millipore (Eschborn), Sterivex   |
| Zellkulturflaschen, 25-175 cm <sup>2</sup> : | Costar (Bodenheim)               |
| Zellschaber:                                 | Greiner (Frickenhausen)          |
| Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml:        | Greiner (Frickenhausen)          |

## 2.12. Molekularbiologische Kits

|                                         |                  |
|-----------------------------------------|------------------|
| QIAquick-spin PCR Purification Kit:     | Qiagen (Hilden)  |
| High Pure PCR Product Purification Kit: | Roche (Mannheim) |
| High Pure Plasmid Isolation Kit:        | Roche (Mannheim) |
| Gel Extraktion Kit:                     | Qiagen (Hilden)  |
| Plasmid-Maxi-Kit:                       | Qiagen (Hilden)  |
| Plasmid Mini/Midi Kit:                  | Qiagen (Hilden)  |

## 2.13. Antibiotika

Plasmid-transformierte Bakterien wurden in Medien mit entsprechendem Antibiotikumzusatz angezogen. Die Antibiotika wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen.

**Tabelle 2.8: Verwendete Antibiotika**

---

| Substanz        | Stammlösung                                   | Endkonzentration |
|-----------------|-----------------------------------------------|------------------|
| Ampicillin      | 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert | 100 µg/ml        |
| Chloramphenicol | 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert | 25 µg/ml         |

---

## 2.14. Zelllinien und Bakterienstämme

### 2.14.1. Zelllinien

Tabelle 2.9: Verwendete Zelllinien

| Zelllinie  | Eigenschaften               | Referenz                         |
|------------|-----------------------------|----------------------------------|
| HFF-Zellen | humane Vorhaut Fibroblasten | Kinderklinik UKD<br>(Düsseldorf) |

### 2.14.2. Bakterienstämme

Tabelle 2.10: Verwendete Bakterienstämme

| Bakterienstamm        | Genotyp                                                                                                                                          |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> JM109: | K-12 derivative, <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdr17</i> ,<br><i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> ( <i>lac-proAB</i> ) |

### 2.14.3. *Toxoplasma gondii*-Stämme

Tabelle 2.11: Verwendete *Toxoplasma gondii*-Stämme

| <i>T. gondii</i> -Stamm | Bezugsquelle                                      |
|-------------------------|---------------------------------------------------|
| RH:                     | Sabin, 1941, ATCC (Manassas, USA)                 |
| RH-ΔGRA5:               | freundliche Gabe von Corinne Mercier (Frankreich) |
| RH-kompGRA5:            | freundliche Gabe von Corinne Mercier (Frankreich) |
| RH-GRA9-myc:            | in dieser Arbeit hergestellte Mutante             |
| RH-GRA9ΔAH-myc:         | in dieser Arbeit hergestellte Mutante             |
| RH-GRA9ΔHH1-myc:        | in dieser Arbeit hergestellte Mutante             |
| RH-GRA9ΔHH2-myc:        | in dieser Arbeit hergestellte Mutante             |

---

|                               |                                       |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| RH-GRA9 $\Delta$ PEST-myc:    | in dieser Arbeit hergestellte Mutante |
| RH-GRA9 $\Delta$ 202-318-myc: | in dieser Arbeit hergestellte Mutante |
| RH-GRA9 $\Delta$ 253-318-myc: | in dieser Arbeit hergestellte Mutante |

### **3. Methoden**

#### **3.1. Mikrobiologische Methoden**

##### **3.1.1. Kultivierung von Bakterien**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden aus Glycerinkulturen oder von Einzelkolonien auf einer Agarplatte in steriles LB-Medium überimpft und über Nacht (ü. N.) bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Das LB-Medium wurde zusätzlich mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt. Eine Subkultivierung in 200 ml Flüssigmedium erfolgte über Tag durch Überführen von 5 ml Bakterien-Vorkultur in frisches LB-Medium und einer sich anschließenden Inkubation bei 37°C. Für eine kurzfristige Lagerung wurden die Bakterienstämme auf LB-Agarplatten (Ampicillin-haltig) ausgestrichen. Eine Inkubation der Agarplatten erfolgte bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C. Die Platten konnten anschließend bei 4°C für 4-6 Wochen gelagert werden.

##### **3.1.2. Stammkulturen**

Eine längerfristige Lagerung von Bakterienkulturen erfolgte in Glycerinkulturen. Dazu wurde 1 ml einer Über-Nacht-Kultur (LB-Medium) mit 200 µl sterilem 87 %-igem (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

##### **3.1.3. Bestimmung der Optischen Dichte**

Über die Messung der Optischen Dichte konnte das Wachstum einer Bakterienkultur im Zeitverlauf verfolgt werden. Die Messung wurde mit Einmal-Halbküvetten (Schichtdicke 1 cm) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) im Spektralphotometer durchgeführt. Der dabei erforderliche Nullabgleich erfolgte gegen unbeimpftes Medium.

### 3.1.4. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung transformations-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde 200 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur (ü. N-Kultur) des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei einer Temperatur von 37°C bis zu einer Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5-0,6 angezogen. Die *E. coli*-Kultur wurde in sterilen 50 ml-Röhrchen für 20 min auf Eis gelagert und anschließend für 5 min bei 4000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml RF1-Lösung aufgenommen und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Nach Resuspension wurden die Zellen erneut für 5 min abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 4 ml RF2-Lösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden 15 min auf Eis gelagert und als 200 µl Aliquots in sterile Cryo-Tubes überführt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### RF1-Lösung

|                   |            |
|-------------------|------------|
| RbCl              | 0,1 M      |
| MnCl <sub>2</sub> | 0,05 M     |
| Kaliumacetat      | 0,03 M     |
| CaCl <sub>2</sub> | 0,01 M     |
| Glycerin          | 15 % (v/v) |
|                   | pH 5,8     |

#### RF2-Lösung

|                   |            |
|-------------------|------------|
| MOPS              | 0,01M      |
| RbCl              | 0,01 M     |
| CaCl <sub>2</sub> | 0,075 mM   |
| Glycerin          | 15 % (v/v) |
|                   | pH 6,8     |

### 3.1.5. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mittels der Hitzeschockmethode. Das Prinzip der Hitzeschockmethode liegt darin, Zellmembranen der Empfängerzellen durch Hitzeeinwirkung kurzzeitig für Moleküle wie DNA durchlässig zu machen. Für die Transformation wurde ein 200 µl Aliquot transformations-kompetenter *E. coli*- Zellen (Kapitel 3.1.4.) langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz (Kapitel 3.2.2.3.) oder ca. 50 bis 500 ng Plasmid-DNA (Kapitel 3.2.1.1.) versetzt. Der Transformationsansatz wurde für 15 min auf Eis gelagert und anschließend einem Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C unterzogen. Die *E. coli*- Zellen wurden erneut für 2 min auf Eis gekühlt, anschließend mit 800 µl LB-Medium versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Jeweils 50 µl und 150 µl Suspension

wurden auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **3.2. Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren**

#### **3.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Die Gewinnung von Plasmid-DNA beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen, wodurch Plasmid-DNA freigesetzt wird, während chromosomale DNA in einem Präzipitat aus Zellwandbestandteilen und Protein eingeschlossen bleibt. Die freigesetzte Plasmid-DNA kann schließlich bei Anwesenheit hoher Konzentrationen eines chaotropen Salzes über spezifische Bindung an die Glasfasermatrix der Trennsäulchen aus der Lösung isoliert werden. Um die gebundene DNA von Salzen, Proteinen oder anderen Verunreinigungen zu befreien, wurde die Matrix 2 x mit Waschpuffer gespült und die DNA anschließend durch Zugabe von 50 µl Nuklease-freiem Wasser oder Niedrigsalz-Puffer von der Säulenmatrix eluiert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde bei –20°C gelagert. Eine Isolierung größerer DNA-Mengen erfolgte unter Nutzung einer 150-200 ml großen Bakterienkultur nach der Vorschrift des Midi- bzw. des Maxi-Präparationskits von Qiagen.

#### **3.2.1.2. Isolierung von genomischer DNA**

Für die Isolierung genomischer *T. gondii*-DNA wurden  $3 \times 10^7$  Toxoplasmen in 400 µl DNA-Lysepuffer mit 20 µg/ml RNaseA aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit 100 µg/ml Proteinase K versetzt und ü. N. bei 50°C im Eppendorfschüttler inkubiert. Nach der ü. N.-Inkubation erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 3.2.1.3.). Mit eiskaltem Ethanol (Lagerung bei -20°C) wurde die genomische DNA anschließend aus dem Überstand gefällt und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die gefällte genomische DNA wurde in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

DNA-Lysepuffer

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| NaCl                            | 100 mM    |
| Tris HCl, pH 8                  | 10 mM     |
| EDTA, pH 8                      | 50 mM     |
| SDS                             | 0,5 %     |
| RNaseA (frisch zugegeben)       | 20 µg/ml  |
| Proteinase K (frisch zugegeben) | 0,1 mg/ml |

**3.2.1.3. Phenol-Chloroform-Extraktion**

Zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen wurde das Verfahren der Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Phenol hat die Eigenschaft, Proteine zu denaturieren, die anschließend in der so genannten Interphase zwischen wässriger Nukleinsäurelösung und der organischen Phenolphase ausfallen. Chloroform bewirkt ebenfalls eine Denaturierung der vorliegenden Proteine und stabilisiert die instabile Phasengrenze. Die DNA-haltige Lösung wurde mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform versetzt und nach kurzem Schütteln für 3 Minuten bei 13.000 rpm und RT abzentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde eine stabile Phasentrennung zwischen der wässrigen und der organischen Phase erzielt. Die obere Phase wurde vorsichtig mit einer Mikropipette abgenommen und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der gewonnene wässrige Überstand wurde bis zum Verlust der Interphase wiederholt extrahiert. Um die gewonnene DNA schließlich von Phenolresten zu reinigen, wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben. Nach kurzem Schütteln erfolgte eine erneute Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm und RT. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die untere Phase verworfen.

**3.2.1.4. Ethanolfällung von Nukleinsäuren**

Die Präzipitation isolierter DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) zur isolierten DNA und anschließendem Auffüllen des 1,5 ml Reaktionsgefäßes mit eiskaltem 97 %-igem Ethanol. Die ausgefallene DNA wurde mit einer Mikropipette aufgewickelt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Entfernung noch assoziierter Salze wurde die DNA zweimal mit eiskaltem Ethanol gewaschen und in 400 µl TE-Puffer aufgenommen. Der DNA-Ansatz wurde mit 20 µl RNase-Lösung versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte die in der Probe vorhandene RNA vollständig abgebaut werden. Die DNA wurde durch Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat und 1 ml eiskaltem 97 %-igem Ethanol wiederholt präzipitiert und mit Hilfe der Mikropipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Verdampfen des restlichen Ethanols bei Raumtemperatur wurde die isolierte DNA in TE-Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.2.1.5. Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen**

Zur Isolierung und Reinigung von dsDNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die zu isolierende Bande mit einem sterilen Skalpell auf dem UV-Schirm bei 340 nm aus dem Gel ausgeschnitten. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die dsDNA anschließend mittels des Gel-Extraktion-Kits (Qiagen) aus dem Gel eluiert. Die Aufreinigung basiert auf einer Bindung der DNA an Silika, wie z.B. Glasmilch unter hohen Salzkonzentrationen. Nach mehrmaligem Waschen mit ethanolischer Lösung wurde die DNA unter Niedrig-Salz-Bedingungen von der Glasmilch-Matrix eluiert und in ein neues Eppendorfggefäß überführt.

### **3.2.1.6. Isolierung von Gesamt-RNA**

Alle Lösungen zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat-behandeltem (DEPC) und autoklaviertem Wasser angesetzt, sowie der gesamte Versuchsablauf mit Handschuhen durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde durch Lyse der Zellen mittels Guanidinium-Isothiocyanat (GSCN) und anschließender Ultrazentrifugation des Lysats auf einem Cäsiumchlorid-Dichtekissen gewonnen. Bei der GSCN-Methode wird die Tatsache ausgenutzt, dass RNA in Cäsiumchlorid eine höhere Schwebedichte besitzt als andere Zellbestandteile. Aufgrund dessen wird RNA bei der Zentrifugation pelletiert, während DNA, Lipide und Proteine im Überstand verbleiben. In einem Greiner-Röhrchen wurden  $10^9$  zweifach mit PBS gewaschene Toxoplasmen mit 4 ml GSCN-Lösung lysiert und die Lösung mit 3 ml DEPC-Wasser (Aqua dest. mit 0,1 % DEPC versetzt) aufgefüllt. In einem Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) wurden 3 ml des Cäsiumchlorid-Dichtekissens vorgelegt und dieses anschließend mit Lysat überschichtet. Das präparierte



Röhrchen wurde bei 13.000 rpm für 16 Stunden bei 23°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckman Optima L60, Rotor SW41Ti, Beckman) und der resultierende Überstand abgesaugt. Das gewonnene RNA- Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 50 µl 10 mM Tris/DEPC-Wasser, pH 7,5 gelöst. Es folgte eine photometrische Konzentrations- und Reinheitsprüfung der RNA (Kapitel 3.2.1.9).

#### GSCN-Lösung

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Guanidinium-Isothiocyanat | 4 M    |
| Natrium-Acetat pH 5,2     | 20 mM  |
| DTT                       | 0,1 mM |
| N-Laurylsarkosin          | 0,5%   |

#### CsCl-Lösung

|               |            |
|---------------|------------|
| Cäsiumchlorid | 5,7 M      |
| EDTA pH 8     | 0,1 M      |
| DEPC          | 0,002 Vol. |

### **3.2.1.7.cDNA-Synthese**

Um bestimmte mRNA-Transkripte in der Gesamt-RNA qualitativ bzw. semiquantitativ nachzuweisen bzw. zu amplifizieren, wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Eine Umschreibung der RNA erfolgte mittels des „Advantage RT-for-PCR Kits“ (BD Biosciences) entsprechend der Herstellerangaben.

### **3.2.1.8.Isolierung von mRNA**

Für eine Gewinnung von messenger-RNA (mRNA) wurde das Oligotex-mRNA-Kit (Qiagen) verwendet. Isolierte Gesamt-RNA wurde dabei 1:1 mit 2 x Bindungspuffer vermischt. Es erfolgte eine Zugabe von 6 µl Oligotex-Suspension pro 100 µg RNA mit anschließender Inkubation für zunächst 3 min bei 65°C und weiteren 10 min bei RT. Die Oligotex-Partikel wurden bei 13.000 rpm für 2 min abzentrifugiert und 2 x mit Waschpuffer gereinigt. Es folgte eine Elution der mRNA mit 2 x 5 µl Elutionspuffer (vorgewärmt bei 70°C) je eingesetzten 100 µg Gesamt-RNA.

### 3.2.1.9. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration verhält sich in Lösungen proportional zu der von ihr absorbierten UV-Strahlung und kann mit der UV-Absorptionsspektrometrie photometrisch ermittelt werden. Die Konzentrationsbestimmung reiner Nukleinsäurelösungen basiert dabei auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Für die Absorption ist das konjugierte Ringsystem der Basen verantwortlich. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird die Probe in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt und die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren bzw. von Proteinen) im Spektralphotometer (Pharmacia LKB Ultraspec Plus, Pharmacia, Freiburg) ermittelt. Die Kalibrierung erfolgt jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel (TE-Puffer oder Aqua dest.). Das Verhältnis der ermittelten Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) gibt Auskunft über Verunreinigungen der Nukleinsäuren. Eine Absorption von 1,0 bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm entspricht einem DNA-Gehalt von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA und 40  $\mu\text{g/ml}$  bei einzelsträngiger DNA und RNA. Bei sauberen Präparationen sollte der  $A_{260}/A_{280}$ -Quotient Werte zwischen 1,7-2,0 besitzen. Bei Kontaminationen durch Proteine oder Phenol liegt der Quotient deutlich niedriger.

### 3.2.2. Enzymatische Reaktionen

#### 3.2.2.1. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Das Verfahren der Restriktion von DNA dient der Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung doppelsträngiger DNA-Moleküle. Bei Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, die sequenzspezifisch Phosphodiesterbindungen von doppelsträngigen DNA-Molekülen spalten. Die Erkennungssequenz ist für jede verwendete Endonuklease spezifisch. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen vom Typ II. Die hydrolytische Spaltung führt, abhängig von der eingesetzten Restriktionsendonuklease, zu glatten Enden („blunt ends“) oder 3'- bzw. 5'-überhängenden Enden („sticky ends“). In beiden Fällen spalten die Restriktionsenzyme die DNA so, dass ein 5'-Phosphat- und ein 3'-OH-Ende entsteht. Ein Einsatz der Restriktionsendonukleasen zur Spaltung von Plasmid- bzw. Gesamt-DNA erfolgte entsprechend der Empfehlungen des Herstellers. Durch Hitzedenaturierung bei

65°C für 20 min oder durch zugegebenen Gelladepuffer wurde die Restriktion gestoppt und die entstandenen Restriktionsfragmente anschließend über Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.3.1.) analysiert.

#### 3.2.2.2. Dephosphorylierung von DNA

Um eine Re-Ligation linearisierter Vektor-Fragmente vor dem Einsatz in Ligationsreaktionen zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA mit „Shrimp-alkalischer-Phosphatase“ (SAP) dephosphoryliert. Durch die Abspaltung wurde die effiziente Insertion von Insert-DNA gewährleistet. Zur Dephosphorylierung wurden 100 pmol überhängende 5'-Enden bzw. 2 pmol glatte Enden mit einer Einheit SAP in 1x SAP-Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 80°C für 20 min gestoppt.

#### 3.2.2.3. Ligation von DNA

Im Rahmen der Ligation werden DNA-Fragmente, die nach der Restriktion (Kapitel 3.2.2.1.) komplementäre überhängende („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“) aufweisen, durch eine DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden. Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA zu einem rekombinanten Plasmid erfolgte durch die ATP- und  $Mg^{2+}$ -abhängige T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim), welche Bindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- sowie 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle katalysiert.

Für eine effiziente Ligationsreaktion wurden die DNA-Konzentrationen von Vektor- und Insert-DNA photometrisch bestimmt und bei einem Gesamtvolumen des Ligationsansatzes von 20 µl in einem molaren Verhältnis von 1:3 – 1:5 eingesetzt. Pro Ligationsansatz wurden zudem 2 µl Ligationspuffer (10 x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (60 U/µl) beigelegt, das Volumen mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und der Ansatz für 15-45 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Ligationsansatz ohne weitere Behandlung zur Transformation (Kapitel 3.1.5.) eingesetzt.

#### 3.2.2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR: Polymerase-Chain-Reaction) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifizierung eines spezifischen Genfragments definierter Länge und Sequenz aus heterogenen Nukleinsäuregemischen. Das Prinzip beruht auf der Amplifizierung eines

Abschnitts der DNA, welcher von speziellen Oligonukleotiden eingegrenzt wird. Voraussetzung für eine PCR ist, dass flankierende Bereiche der Zielsequenz („Template“-DNA) bekannt sind (Saiki *et al.*, 1988; Ehrlich *et al.*, 1991). Entsprechende komplementäre Oligonukleotide („Primer“) können synthetisiert werden, die mit der „Template“-DNA hybridisieren. Die Oligonukleotid-„Template“-DNA-Hybridisierung erfolgt dabei anti-parallel an beiden Strängen. Bei der PCR wird durch einen wiederholten Ablauf von Strangtrennung, Bindung der spezifischen Oligonukleotide und DNA-Synthese mit hitzestabiler DNA-Polymerase eine exponentielle Synthese von DNA-Molekülen aus Desoxynukleosid-Triphosphaten erzielt. Zur Synthese von DNA-Fragmenten, die einer analytischen Untersuchung dienten, wurde in dieser Arbeit die *Taq*-DNA-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) verwendet. Für Klonierungen wurde die „expand high fidelity“ DNA-Polymerase (aus *Pyranococcus furiosus*) herangezogen, die im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase eine so genannte 3'→5'-Exonuklease-Aktivität („proof-reading“) besitzt und dadurch eine geringere Fehlerrate aufweist. Der Reaktionsansatz wird im Thermocycler dem jeweils passenden Programm unterzogen. Die dabei amplifizierte DNA kann anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.3.1) analysiert oder isoliert und für eine Klonierungsreaktion (Kapitel 3.2.2.6) genutzt werden.

Für einen analytischen PCR-Ansatz wurden die folgenden Komponenten verwendet:

| <u>50 µl-Standard-Reaktionsansatz</u> | <u>Standard-Thermoprofil</u> |         |
|---------------------------------------|------------------------------|---------|
| 1 ng-200 ng Template-DNA              | 95°C                         | 5 min   |
| 2,5 U DNA-Polymerase                  | 95°C                         | 30 s    |
| 400 µM dNTP-Mix                       | 62°C                         | 30-60 s |
| 1 µM je Primer                        | 72°C                         | 60 s    |
| 5 µl Polymerase-Puffer (10 x)         | 72°C                         | 7 min   |
| ad 50 µl Aqua dest.                   | 4°C                          | ∞       |

} 30 Zyklen

### 3.2.2.5. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen von PCR-Fragmenten und klonierten Vektoren erfolgten durch die Firma GATC (Konstanz, Germany) mittels spezifischer Primer und Fluoreszenz-markierten

Didesoxynukleotiden auf einem ABI 3700 Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA).

### 3.2.2.6. Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten beruht auf der Verwendung von Restriktionsschnittstellen, die in „Primer“-Sequenzen der DNA eingefügt werden. Um PCR-Produkte über solche Restriktionsschnittstellen zu klonieren, wurden Oligonukleotide eingesetzt, die an ihren 5'-Enden spezifische Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen besitzen. Bei den Erkennungssequenzen handelt es sich im Gegensatz zu den homologen Bereichen lediglich um kurze Sequenzbereiche. Für eine erfolgreiche und gerichtete Klonierung wurden in dieser Arbeit Primer konzipiert, die eine *AvrII*-Schnittstelle im „reverse“-Primer sowie eine *BglII*-Schnittstelle im „forward“-Primer aufwiesen. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und konnten in den Expressionsvektor pTub-myc ligiert werden, der zuvor mit gleichen Endonukleasen behandelt wurde.

## 3.3. Gelelektrophoretische Analysen

### 3.3.1. Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Zur Trennung und Analyse von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese herangezogen. Bei der Elektrophorese erfolgt die Wanderung und Auftrennung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld. Die Ladungsträger der Nukleinsäuren sind die negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle in Richtung Anode hängt von der Molekülgröße und der Agarosekonzentration des Gels ab. Durch Änderung der Agarosekonzentration (0,5-2,0 %) können die Porengröße und somit auch der Fragment-Größenbereich, der besonders effektiv aufgetrennt werden soll, angepasst werden.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde die entsprechende Agarosemenge in 100 ml 1 x TBE-Puffer aufgekocht, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung versehen und in einen Gelschlitten eingegossen. Zur Erzeugung von Probenfächern wurden zwei Probenkämme in die Präparation eingespannt. Nach Erkalten wurde das Gel mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Die zu

analysierenden DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Gelladepuffer versehen und in die Probentaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 60-100 Volt. Nach Beendigung konnten die interkalierten Ethidiumbromidmoleküle mit UV-Licht einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und die DNA-Fragmente somit sichtbar gemacht werden (Gelaufnahmegerät Transilluminator Bio Doc Analyze, Biometra, Göttingen). Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen diente der „1-kb- Leiter“ als Vergleichsstandard.

#### 5 x DNA-Probenpuffer

|                   |              |
|-------------------|--------------|
| Ficoll Typ 400    | 15 % (w/v)   |
| Bromphenolblau    | 0,25 % (w/v) |
| Xylencyanol       | 0,25 % (w/v) |
| in 5 x TBE Puffer |              |

### **3.3.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1970). Das Prinzip beruht auf Proteinwanderung im elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Proteingemische können auf diese Weise nach Ladung und Masse aufgetrennt und die molekulare Masse von Proteinen bestimmt werden. Im Rahmen der Denaturierung bei 100°C lagert sich Natriumdodecylsulfat (englisch: Sodiumdodecylsulfate, SDS) an die hydrophoben Bereiche der Proteine an, wodurch eine gleichmäßig negative Ladung entsteht und die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Zusätzlich bewirkt  $\beta$ -Mercaptoethanol eine Reduzierung von vorhandenen Disulfidbrücken, wodurch die Stabilität der Proteine erniedrigt wird und die Proteine in ihre Untereinheiten zerfallen. Für die SDS-PAGE wird Acrylamid als Trägermaterial eingesetzt, das durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) radikalisch auspolymerisiert. Durch N,N'-Methylenbisacrylamid werden die ausgebildeten linearen Polyacrylamidmoleküle miteinander quervernetzt. Beim Gellauf werden die zu analysierenden Proteine zunächst in einem Sammelgel fokussiert und dann in einem Trenngel aufgetrennt. Vor der Auftrennung im Gel wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 100°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 140 Volt über einen Zeitraum von 1-2 h.

Durch Erstellung einer Kalibrierungsgeraden lässt sich die molekulare Masse unbekannter Proteine mit Hilfe mitgeführter Marker wie SeeBlue Plus2 bestimmen. Die Wanderungsstrecke der Proteine ist dabei antiproportional zum Logarithmus der Molekularmasse.

#### SDS-Probenpuffer

|                        |                |
|------------------------|----------------|
| 50 % Glycerin          | 25 ml          |
| SDS                    | 2 g            |
| β-Mercaptoethanol      | 5 % (w/v)      |
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 | 75ml           |
| Bromphenolblau         | 1 Spatelspitze |

#### SDS-Laufpuffer:

|            |              |
|------------|--------------|
| Tris-Base  | 6 g (w/v)    |
| Glycin     | 28,8 g (w/v) |
| SDS        | 1 g (w/v)    |
| Aqua dest. | ad 1000 ml   |

#### Sammelgelpuffer

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Tris-Base            | 60,0 g     |
| Aqua dest. (entgast) | ad 1000 ml |
| pH 6,8 mit HCl       |            |

#### Trenngelpuffer

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Tris-Base            | 181,5 g    |
| Aqua dest. (entgast) | ad 1000 ml |
| pH 8,8 mit HCl       |            |

#### Acrylamidlösung

Rotiphorese Gel 30 (gebrauchsfertige Lösung; 37 Anteile Acrylamid, 1 Anteil 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid; Fa. Roth, Karlsruhe)

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung des 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgels aufgezeigt:

**Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele**

| Stammlösung            | Sammelgel | Trenngel (12 %) |
|------------------------|-----------|-----------------|
| Sammelgelpuffer        | 2,5 ml    | -               |
| Trenngelpuffer         | -         | 5 ml            |
| Acrylamidlösung (30 %) | 1 ml      | 8 ml            |
| Aqua dest.             | 6,5 ml    | 6 ml            |
| SDS (10 %)             | 100 µl    | 200 µl          |
| APS (10 %)             | 100 µl    | 180 µl          |
| TEMED                  | 12 µl     | 20 µl           |

Das 12 %-ige Trenngel wurde zunächst bis 2 cm unterhalb des Randes in eine Gelvorrichtung eingegossen und zur Gewährleistung einer ebenen Trennfläche mit n-Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das n-Butanol verworfen und die Kammer mit Sammelgel aufgefüllt. Ein eingespannter Probenkamm sorgte im Sammelgel für die Ausbildung von Probestaschen zum späteren Beladen des Gels.

Neben selbst hergestellten Polyacrylamidgelen wurden in dieser Arbeit zusätzlich kommerziell erhältliche 10 %-ige NuPage-Polyacrylamidgele der Firma Invitrogen verwendet.

### 3.4. Proteinanalytische Methoden

#### 3.4.1. Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine können mit Hilfe einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung im Gel sichtbar gemacht werden. Zur Färbung wurde das Gel auf einem Kippschüttler für ca. 1 h bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Lösung wurde vorsichtig abgegossen und für eine Wiederverwertung gesammelt. Zur Entfernung überschüssiger Farbrückstände wurde das Gel anschließend mit H<sub>2</sub>O gespült und die überschüssige Farbe mit Entfärberlösung unter Schwenken entfernt, bis blau gefärbte Proteinbanden deutlich im Gel sichtbar wurden.

##### Coomassie-Brilliant Blau-Färbelösung

|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| Coomassie-Brilliant Blau R 250 | 0,1 % (w/v) |
| Ethanol                        | 50 % (v/v)  |
| Essigsäure                     | 7,5 % (v/v) |

##### Entfärberlösung

|            |             |
|------------|-------------|
| Ethanol    | 20 % (v/v)  |
| Essigsäure | 7,5 % (v/v) |

#### 3.4.2. Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (Kapitel 3.3.2.) durch „Semidry-Blotting“ („CarboGlas“, Schleicher & Schüll, Dassel) elektrophoretisch auf eine Protein-bindende Nitrozellulosemembran transferiert.

Für den Transfer wurden drei in Kathodenpuffer getränkte 3 MM'-Whatman-Papiere, die der Größe des Gels entsprachen, auf die mit Kathodenpuffer angefeuchtete Kathodenplatte des



„Semidry-Blot“-Gerätes gelegt. Anschließend wurden das Gel sowie die angefeuchtete Membran luftblasenfrei aufgebracht, um den späteren Proteintransfer nicht zu behindern.

Der Ansatz wurde mit drei in Anodenpuffer I und drei weiteren in Anodenpuffer II getränkten Filterpapieren abgedeckt und mit dem Anodendeckel des „Semidry“-Gerätes verschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer angelegten Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche über einen Zeitraum von 90 min. Die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine konnten weiter immunologisch durch spezifische Antikörper analysiert werden (Kapitel 3.4.4.).

#### Kathodenpuffer

|                   |             |
|-------------------|-------------|
| Tris              | 25 mM (w/v) |
| 6-Aminohexansäure | 40 mM (w/v) |
| Methanol          | 20 % (v/v)  |

#### Anodenpuffer I

|          |             |
|----------|-------------|
| Tris     | 30 mM (w/v) |
| Methanol | 20 % (v/v)  |

#### Anodenpuffer II

|          |              |
|----------|--------------|
| Tris     | 300 mM (w/v) |
| Methanol | 20 % (v/v)   |

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine im kommerziell erhältlichen 10 %-igem NuPage-Polyacrylamidgel wurde spezieller NuPage-Blot-Puffer der Firma Invitrogen verwendet, der vor Nutzung mit Methanol und Reinstwasser versetzt wurde (50 ml NuPage-Blot-Puffer, 200 ml Methanol, 750 ml Reinstwasser).

### **3.4.3. Reversible Färbung der transferierten Proteine mit Ponceau S**

Für einen schnellen Nachweis einer erfolgreichen Proteinübertragung auf die Nitrozellulose-Membran können die Proteine reversibel mit Ponceau S angefärbt werden. Die Membran wurde vor dem Blocken für 10 min mit Ponceau S-Lösung überschichtet und langsam geschwenkt. Die Ponceau S-Lösung wurde zur weiteren Verwendung gesammelt und die Membran mit Aqua dest. gespült, bis einzelne rote Banden entsprechend der Proteine sichtbar wurden. Eine komplette Entfärbung konnte anschließend mit PBS oder H<sub>2</sub>O bewirkt werden.

Ponceau S-Färbelösung

|                    |             |
|--------------------|-------------|
| Ponceau S          | 0,2 % (w/v) |
| Trichloressigsäure | 3,0 % (w/v) |

**3.4.4. Immunchemischer Nachweis von Proteinen**

Durch den immunchemischen Nachweis können die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine (Kapitel 3.4.2.) durch spezifische Primärantikörper und Enzymgekoppelte Sekundärantikörper detektiert werden. Nach dem Elektrotransfer der Proteine wurde die Nitrozellulose-Membran zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindestellen für 1 h bei RT in Blocklösung (5 %-iges fettfreies Milchpulver in PBS) unter leichtem Schütteln inkubiert. Primäre sowie Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurden in Blocklösung verdünnt und nacheinander für jeweils mindestens 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Im Anschluss an jede Inkubation wurde die Membran zweimal für 5 min mit PBS gewaschen.

Zur Detektion spielt das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym Peroxidase eine entscheidende Rolle. Durch Peroxidase wird das verwendete Chemilumineszenz-Substrat umgewandelt und die daraus resultierende Lichtemission schließlich mit einem Röntgenfilm (Kodak) detektiert. Die Immunodetektion erfolgte mit dem „Enhanced Chemiluminescence (ECL)“-System entsprechend der Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech). Die Expositionszeit erwies sich dabei abhängig von der Signalstärke und verlief in einem Zeitraum von 15 Sekunden bis 12 Minuten. Der Röntgenfilm wurde anschließend mit Hilfe der Agfa-Entwicklermaschine entwickelt und die Proteinbanden durch Vergleich mit der Markerbande auf der Nitrozellulosemembran ausgewertet.

**3.4.5. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse**

Zur Analyse der Lokalisierung bzw. Expression eines Proteins wird durch Fixierung und anschließendes Permeabilisieren von Zellen sowie Inkubation mit Antikörpern gegen das entsprechende Protein eine Immunfluoreszenz-Detektion ermöglicht. Dafür wurde das Verfahren der direkten bzw. der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird der Fluoreszenzfarbstoff durch Licht der richtigen Wellenlänge

angeregt und sichtbar gemacht. Für den Nachweis wurden HFF-Zellen als Wirtszellen verwendet, die als Monolayer auf Glasplättchen in 24-well Platten angezogen wurden. Die Zellen wurden für mindestens 24 h mit Tachyzoiten infiziert, bis die Vakuolen ca. 4-8 Tachyzoiten enthielten. Die Zellmonolayer wurden im Folgenden mit PBS (RT) gewaschen und mit 1 ml 3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 0,25 % (v/v) Triton-X-100 in PBS für 15 min permeabilisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Zellen mit 1 ml 1 % (w/v) BSA/PBS oder Ziegen-Serum für 30 Minuten bei RT inkubiert. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten auf einem Kippschüttler. Die Markierung mit Antikörpern erfolgte durch eine 1-stündige Inkubation mit den relevanten Antikörpern, adäquat verdünnt in 0,1 % (w/v) BSA/PBS oder Ziegen-Serum. Nach einem 3 x 10-minütigen Waschschrift mit PBS (RT) erfolgte die Inkubation mit den sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern für 1 h. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde erneut 3 x 10 min mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend für 5 min mit 0,1 mg/ml DAPI/PBS gefärbt. Der Farbstoff DAPI interkaliert dabei in die DNA und erzeugt bei der Anregung ein blaues Fluoreszenzlicht.

Die Glasplättchen wurden nochmals mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger in einem Tropfen Fluoromont G (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) eingebettet. In Kartonmappen wurden die Präparate bis zur vollständigen Trocknung über Nacht bei 4°C abgedunkelt gelagert und konnten schließlich mit einem Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE 200 (Nikon) betrachtet und über eine Digitalkamera aufgenommen werden. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte computergestützt über den Adobe Photoshop.

### 3.4.6. Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) führt zu einer Degradierung der Proteine, wodurch enzymatische Aktivitäten häufig verloren gehen. Antigen determinanten bleiben jedoch zumeist erhalten, wodurch die TCA-Präzipitation zur Konzentrierung von Proteinen für eine anschließende Western-Blot-Analyse genutzt werden kann. Durch Zugabe von eiskalter 50 %-iger Trichloressigsäure (Endkonzentration 10 % TCA) und anschließender Inkubation für 4 h auf Eis wurden die Proteine gefällt. Es folgte ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei 60°C. Die Isolierung der Proteine erfolgte durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Pellet mit 300 µl eiskaltem Aceton versetzt und erneut 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet für 5 min an der Luft getrocknet und in 10-15 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Bei auftretender Gelbfärbung wurde der pH-Wert des Ansatzes durch Zugabe von 1 µl 1 M Tris-Lösung (pH 8) neutralisiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben anschließend für 5 min bei 100°C inkubiert. Die Analyse der gereinigten Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 3.3.2.).

### 3.4.7. *In vitro*-Induktion von „excreted-secreted-antigens“ (ESA)

Zur *in vitro*-Induktion von ESAs in *T. gondii* (Darcy *et al*, 1988) wurden  $1,5 \times 10^8$  Tachyzoiten geerntet, in 1,5 ml RPMI 1640 (mit 10 % FCS supplementiert) aufgenommen und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Toxoplasmen wurden anschließend durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 2.800 rpm pelletiert und der resultierende ESA-haltige Überstand durch eine 0,22 µm Millipore-Membran filtriert. Der Überstand wurde zudem mit 100 U/ml Aprotinin oder 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) versetzt und bei –70°C gelagert.

### 3.4.8. Herstellung von *Toxoplasma gondii*-Lysat

Die Präparation von *T. gondii*-Lysat beruht auf einer wiederholten Einfrier- und Auftaumethode (Freeze/Thaw), bei der Zellen mechanisch aufgebrochen werden. Dazu wurden Toxoplasmen geerntet, zweimal in PBS gewaschen und für 10 min bei 2.800 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die gewonnenen Sedimente wurden in Proteaseinhibitor-haltigem PBS aufgenommen und auf eine Anzahl von  $10^9$  Toxoplasmen/ml eingestellt. Die Suspension wurde dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zwischen jedem Schritt bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Um große Membrantrümmer und nicht aufgeschlossene Toxoplasmen abzutrennen, wurde das Lysat erneut für 10 min bei 2.800 rpm und 4°C zentrifugiert und der erhaltene Überstand für weitere 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der dadurch resultierende Überstand enthält primär die löslichen Proteine von *T. gondii*-Tachyzoiten und wird als *T. gondii*-Lysat (TLA) bezeichnet. Es erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration und eine anschließende Lagerung bei -70°C.

### 3.4.9. Aufschließen von Zellen durch Ultraschall

Eine weitere Möglichkeit Zellen mechanisch aufzubrechen, ist die so genannte Sonifizierung. Dabei werden die gewonnenen Sedimente (Tachyzoiten oder HFF-Zellen) in 4°C kaltem Proteaseinhibitor-haltigem PBS bzw. PBS mit 0,2 % Triton-X-100 (um einen Aufbruch der Zellen sicherzustellen) aufgenommen und anschließend im Eisbad mit Ultraschall behandelt (Sonifikator, Cuphorn). Die Sonifizierung erfolgte 3 x für jeweils 60 Sekunden. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C. Die Proteintrennung erfolgte im SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 3.3.2.).

### 3.4.10. Triton-X-114-Partitionierung

Für die mechanische Gewinnung von *T. gondii*-Lysat wurden frisch geerntete Tachyzoiten ( $1-5 \times 10^9$ ) verwendet. Die Parasiten wurden über eine 3 µm-Membran filtriert und für 15 min bei 2.800 rpm und bei 4°C abzentrifugiert. Das gewonnene Sediment wurde in 500 µl Proteaseinhibitor-haltigem PBS mit EGTA (10 mM) resuspendiert. Es folgte eine weitere Zugabe von 200 µl 10 % Triton-X-114 (verdünnt in PBS) und eine Inkubation für 1 h auf Eis. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das gewonnene Pellet (die sog. „insoluble fraction“) zweimal mit PBS gewaschen. Der Überstand hingegen wurde für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend für wiederum 10 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert, wodurch eine Auftrennung in eine wässrige und eine Detergenzphase erfolgte. Die Detergenzphase wurde anschließend 3 x mit PBS sowie die wässrige Phase 3 x mit 10 % Triton-X-114 extrahiert und jeweils durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und RT partitioniert. Beide Phasen wurden mit zwei Volumina eiskaltem Aceton (-20°C) über Nacht bei -20°C gefällt und das entstandene Präzipitat für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Proben wurden anschließend mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Alle Fraktionen wurden in PBS aufgenommen und im SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Kapitel 3.3.2.).

### 3.4.11. Isolierung intrazellulärer Toxoplasmen und Membran-assoziiierter Proteine

Um die biochemischen Eigenschaften von Proteinen in der Parasitophoren Vakuole (PV) analysieren zu können, wurden HFF-Zellen mit Toxoplasmen infiziert. Nach 24-36 h (ca. 8-16 Tachyzoiten pro Vakuole) wurden die Zellen mechanisch, durch Abkratzen mit einem Zellschaber, vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Die Zellsuspension wurde in Proteaseinhibitor-haltigem PBS aufgenommen und durch eine 27-gauge Kanüle gepresst, um die Toxoplasmen aus den Zellen freizusetzen. Durch anschließendes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37°C (Freeze/Thaw) wurden die Zellen zusätzlich mechanisch aufgebrochen. Zur Abtrennung von noch intakten Parasiten und Zellbruchstücken erfolgte eine Zentrifugation bei 2.800 rpm für 10 min. Der gewonnene Überstand konnte bei -70°C längerfristig gelagert werden, oder direkt im Anschluss für eine Zellfraktionierung (Kapitel 3.4.12.) weiter verwendet werden.

### 3.4.12. Zellfraktionierung von *Toxoplasma gondii*

Das durch Schockgefrieren gewonnene Lysat (TLA) extrazellulärer Toxoplasmen bzw. das Lysat der Parasitophoren Vakuole wurde zunächst einer Zentrifugation bei 3.200 rpm unterzogen, um Zellbruchstücke, Organellen, nukleäre Komponenten und unaufgeschlossene Parasiten aus dem Lysat zu entfernen. Durch eine Ultrazentrifugation des gewonnenen Überstands bei 45.000 rpm und 4°C für 1 Stunde erfolgte die Auftrennung in eine „high speed supernatant“ Fraktion (HSS) sowie eine „high speed pellet“ Fraktion (HSP). Die erhaltene HSP-Fraktion wurde anschließend in 2 x Probenpuffer aufgenommen. Die gewonnene HSS-Fraktion wurde hingegen mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert (Kapitel 3.4.6.) und anschließend ebenfalls in 2 x Probenpuffer gelöst. Zur detaillierten Analyse einer Bindung von Proteinen an Strukturen innerhalb der PV konnte die erhaltene HSP-Fraktion, entgegen einer direkten Analyse im SDS-Polyacrylamidgel, für eine Behandlung mit verschiedenen denaturierenden Agenzien weiter genutzt werden. Dafür wurde die HSP-Fraktion mit 1 % NP40, 6 M Harnstoff, 0,5 M KCl oder 0,1 M Natrium-Carbonat für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 1-stündige Ultrazentrifugation bei 45.000 rpm und 4°C. Die extrahierten Proteine wurden anschließend mittels Aceton oder 10 % Trichloressigsäure (TCA) aus dem Überstand präzipitiert und in 2 x Probenpuffer aufgenommen.

### 3.4.13. Immunpräzipitation mit immobilisierter Protein-G-Sepharose

Um eine mögliche Interaktion des GRA9-Proteins mit anderen GRA-Proteinen nachzuweisen, wurde das Verfahren der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) herangezogen. Die Immunpräzipitationsmethode diente der Isolierung eines definierten Antigens aus einer Vielzahl von Antigenen eines Lysats. Da bei einer Isolierung neben Antigenen und Antikörpern noch eine Vielzahl anderer Proteine mitgezogen wird, erfolgte der Einsatz des Antikörpers im Überschuss, so dass die Bildung eines Präzipitats vermindert wurde. Für die Durchführung der Co-Immunpräzipitation wurde ca. 1 ml gewonnenes *T. gondii*-Lysat (Kapitel 3.4.8) mit 100 µl Protein-G-Sepharose (UltraLink, Pierce) versetzt und der Ansatz für 30 min und 4°C auf einem Drehschüttler geschwenkt. Durch die Zugabe von Protein-G-Sepharose konnten unspezifisch an der Matrix bindende Proteine durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C aus der Probe entfernt werden („Precleaning“). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 50 µl des polyklonalen GRA9-Antiserums über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die im Überstand enthaltenen Antigen-Antikörper-Komplexe konnten anschließend aus der Probe isoliert werden. Dazu wurden dem Überstand am Folgetag 100 µl Protein-G-Sepharose zugesetzt und der Ansatz für 1 h bei 4°C geschwenkt. Die gebildeten Antikörper-Protein-Komplexe wurde an die Protein-G-Sepharose-Matrix gebunden und konnten durch Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, 4°C) vom Überstand getrennt werden. Das Pellet wurde schließlich zweimal mit 500 µl IP-Lysepuffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach Erhitzen der Probe auf 100°C für 10 min wurde die Sepharose erneut bei 13.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Nachweis einer möglichen Protein-Protein-Interaktion von GRA-Proteinen aus *T. gondii* erfolgte nach SDS-PAGE (Kapitel 3.3.2.) mit einem immunchemischen Nachweis der Proteine im Western-Blot (Kapitel 3.4.2.).

#### Lysepuffer

|                            |                     |
|----------------------------|---------------------|
| Tris-HCl, pH 7,5           | 50 mM               |
| NaCl                       | 150 mM              |
| Proteaseinhibitor-Cocktail | 2-fach konzentriert |

### 3.4.13.1. Protein-Protein-Interaktionsuntersuchung in der Parasitophoren Vakuole

Um die Interaktion von GRA9 mit anderen GRA-Proteinen in der Parasitophoren Vakuole (PV) zu analysieren, mussten die möglichen Protein-Protein-Komplexe mit GRA9 aus dem Lysat der Parasitophoren Vakuole gewonnen werden. Dazu wurden Tachyzoiten-infizierte HFF-Zellen 24-36 h nach der Infektion mit PBS gespült, mechanisch mit einem Zellschaber vom Kulturflaschenboden gelöst und in 1 ml modifiziertem IP-Puffer aufgenommen. Die gewonnene Zellsuspension wurde 3 x durch eine 27-gauge Kanüle gepresst und anschließend durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 600 rpm in einen Tachyzoiten-haltigen Überstand und in ein membranöses Pellet getrennt. Der Überstand wurde erneut bei 2.800 rpm abzentrifugiert und die enthaltenen Tachyzoiten pelletiert. Der resultierende Überstand wurde mit dem membranösen Pellet der 600 rpm-Zentrifugation vermengt, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 x für 30 Sekunden einer Ultraschall-Behandlungen im Eisbad unterzogen (Sonifikator, Cuphorn). Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min. Der gewonnene Überstand wurde anschließend einer Immunpräzipitation (Kapitel 3.4.13.) unterzogen und die isolierten Protein-Protein-Interaktionen im SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 3.3.2.) mit anschließendem immunchemischem Nachweis im Western-Blot (Kapitel 3.4.2.) analysiert.

## 3.5. Erzeugung von *Toxoplasma gondii*-Mutanten

Für eine Generierung überexprimierender GRA-Mutanten sowie der GRA9-Deletionsmutanten wurde *T. gondii* genetisch manipuliert und die konstruierten, stabilen Mutanten weiter kloniert. Als Vektor für die Toxoplasma-Transfektion wurden das Plasmid pTub-myc (Boris Striepen, Athens, USA) verwendet. Um die Klonierung in den Vektor pTub-myc zu erleichtern, erfolgte eine Vorklonierung in den kommerziell erhältlichen Vektor pGEM-T der Firma Promega.

### 3.5.1. Überexpression von Proteinen in *Toxoplasma gondii*

Für die Erzeugung der überexprimierenden GRA9-myc-Deletionsmutanten wurden Vektoren hergestellt, die eine Expression des entsprechenden GRA-Proteins mit terminalem myc-Epitop ermöglichten. In den Vektor pTub-myc wurde die cDNA für das spezifische GRA-Protein



bzw. das mit entsprechender Deletion konstruierte GRA9-Insert unter der Kontrolle des  $\beta$ -*Tubulin*-Promotors eingefügt. An die Sequenzen wurde zudem vor dem Stop-Codon die Sequenz für das myc-Epitop als „tag“ eingebracht (EQKLISEEDL). Für die Herstellung des GRA9-Fusionsproteins bzw. von C-terminal verkürzten GRA9-myc-Proteinen wurden PCR-Fragmente mit den Primern *Bgl*II GRA9-mycfor und *Avr*II GRA9-rev bzw. *Avr*II-GRA9 $\Delta$ 202-318mycrev oder *Avr*II-GRA9 $\Delta$ 253-318mycrev amplifiziert (die genaue Bezeichnung für die einzelnen GRA-Mutanten ist dem Materialteil zu entnehmen). Als Matrize für die PCR wurde cDNA aus RH-Parasiten verwendet. Die amplifizierten Konstrukte wurden mit *Bgl*II und *Avr*II restringiert und konnten in den ebenfalls mit *Bgl*II und *Avr*II geschnittenen Vektor pTUB-myc eingefügt werden. Die resultierenden GRA-Expressionsplasmide wurden entsprechend der Ausgangssequenz als pTubGRA9-myc, pTubGRA9 $\Delta$ 202-318-myc und pTubGRA9 $\Delta$ 253-318-myc bezeichnet. Die Herstellung von GRA9-myc-Deletionsmutanten erfolgte durch in der GRA9-Sequenz liegende Primer, die den jeweils zu deletierenden Sequenzbereich flankierten. Durch Verwendung des entsprechenden C- (*Avr*II GRA9-rev) bzw. N-terminalen Gegen-Primer (*Bgl*II GRA9-mycfor) wurden Einzelfragmente des GRA9 amplifiziert, die anschließend durch eine Ligation miteinander verbunden wurden. Für eine erfolgreiche Ligation der Einzelfragmente wurden die amplifizierten PCR-Produkte zuvor mit Polynukleotidkinase phosphoryliert, um überhängende Phosphatreste zu gewährleisten. Die konstruierten Deletionsmutanten von GRA9 sind im Materialteil als pTubGRA9- $\Delta$ AH-myc, pTubGRA9 $\Delta$ HH1-myc, pTubGRA9 $\Delta$ HH2-myc und pTubGRA9 $\Delta$ PEST-myc aufgeführt. Eine Richtigkeit der konstruierten Plasmide wurde über eine Restriktionsanalyse mit anschließender Sequenzierung (Kapitel 3.2.2.5.) sichergestellt.

### 3.5.2. Transfektion von *Toxoplasma gondii*

Die Transfektion von *T. gondii* wurde mittels Elektroporation (Roos *et al.*, 1994) durchgeführt. Für den DNA-Transfer in Tachyzoiten von *T. gondii* war es notwendig, reine Tachyzoiten-Präparationen zu verwenden. Tachyzoiten-haltige Zellsuspensionen (HFF) wurden dafür 3 x durch eine 27-gauge Kanüle gepresst. Die dabei entstehenden Scherkräfte bewirken, dass noch intakte Wirtszellen aufgebrochen und die intrazellulär verbliebenen Tachyzoiten freigesetzt wurden. Nach differentieller Zentrifugation wurden die Parasiten für 10 min bei 2.800 rpm geerntet und in mit 2 mM ATP und 5 mM Glutathion komplementiertem Cytomix aufgenommen, so dass  $1 \times 10^8$  Toxoplasmen/ml vorlagen. Zur Suspension wurden 60 bis 100

µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA hinzu gegeben und für die Elektroporation 800 µl des Ansatzes in eine 0,4 cm Elektroporationsküvette (Biorad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2.000 V, 25 Ω und 25 µF im Electro Cell Manipulator Genepulser II der Firma Biorad. Die transfizierten Parasiten wurden danach für 15 min in der Elektroporationsküvette bei RT inkubiert und die Parasiten anschließend in eine konfluente 25 cm<sup>2</sup> Flasche mit HFF-Zellen überführt und bei 37°C inkubiert.

#### Cytomix

|                                                                           |         |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| KCl                                                                       | 120 mM  |
| CaCl <sub>2</sub>                                                         | 0,15 mM |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,6 | 10 mM   |
| HEPES, pH 7,6                                                             | 25 mM   |
| EDTA                                                                      | 2 mM    |
| MgCl <sub>2</sub>                                                         | 5 mM    |
| ATP, frisch zugegeben                                                     | 2 mM    |
| Glutathion, frisch zugegeben                                              | 5 mM    |

### **3.5.3. Isolierung stabiler *Toxoplasma gondii*-Transfektanten**

Für eine Isolierung stabiler *T. gondii*-Transfektanten musste eine Integration des transfizierten Plasmids im Genom erfolgen, so dass eine Weitervererbung an die Tochterparasiten ermöglicht war. Um eine Reinkultur transfizierter Tachyzoiten erzielen zu können, war zudem eine Antibiotika-Resistenz notwendig, die auf dem Plasmid kodiert vorliegt. Mit dem entsprechenden Antibiotikum konnten die transfizierten Parasiten selektioniert werden.

Zur Isolierung der stabilen Transfektanten wurden die elektroporierten *T. gondii*-Kulturen 24 h nach Infektion (Tachyzoiten in HFF-Zellen) mit 20 µM Chloramphenicol versetzt. Die Antibiotikum-Konzentration von 20 µM Chloramphenicol ist für eine Selektion der transfizierten Tachyzoiten ausreichend und zeigt nur geringfügig toxische Effekte auf die HFF-Wirtszellen (Kim *et al.*, 1993). Die infizierten HFF-Zellen wurden täglich mikroskopisch analysiert. Sobald ca. 80 bis 90 % der Tachyzoiten extrazellulär vorlagen, wurden 10 % der Kultur in eine konfluent bewachsene HFF-Flasche mit IMDM-Medium/+20µM Chloramphenicol überimpft. Bis zu einer deutlich auftretenden Selektion war eine Kulturdauer

von etwa 7-8 Tagen notwendig. Parasiten, die das Plasmid nicht aufgenommen hatten, waren über diese Zeitdauer hinaus nicht mehr lebensfähig. Nach ca. 14 Tagen unter ständiger Chloramphenicolresistenz wurden die überlebenden Parasiten als resistent beurteilt. Da die erhaltenen Mutanten danach auch ohne Selektionsdruck weiterhin das myc-Fusionskonstrukt exprimierten, kann davon ausgegangen werden, dass sie das Plasmid erfolgreich in ihr Genom integriert haben.

#### 3.5.4. Klonierung von *Toxoplasma gondii*

Um nach erfolgter Selektion Parasiten mit definiertem Genotyp isolieren zu können, wurde die polyklonale Population transfizierter Parasiten kloniert. Dazu wurden Verdünnungsreihen mit definierter Anzahl an Parasiten auf einer mit HFF-Wirtszellen beschichteten Mikrotiterplatte (96-er Platte) ausgesät. Die Verdünnung erfolgte bis zu einer berechneten Anzahl von 1 Parasiten pro Well. Nach fünf bis sieben Tagen Inkubation in 100 µl 20 µM Chloramphenicolhaltigem Selektionsmedium (IMDM + 10 % FCS) bei 37°C im Brutschrank wurden die Wells der 96-er Mikrotiterplatte mikroskopisch begutachtet. Sobald einzelne Parasitenklone als Plaques mit nur einem Lysehof im HFF-Monolayer angewachsen waren, konnten diese als klonale Linie weitergeführt werden. Die identifizierten Parasiten wurden geerntet und expandiert.

#### 3.5.5. *Toxoplasma gondii*-Proliferationstest

Das Prinzip der Proliferationsanalyse von *T. gondii* beruht auf dem Einbau von radioaktivem <sup>3</sup>H-Uracil in die Toxoplasmen (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977). Nur in Anwesenheit der Uracil-Phosphoribosyl-Transferase kann Uracil direkt in die RNA eingebaut werden. Da Toxoplasmen eine 100-fach höhere Aktivität dieses Enzyms aufweisen als die Wirtszellen, wird Uracil bevorzugt in die sich vermehrenden Parasiten aufgenommen. Zur Quantifizierung der *T. gondii*-Proliferation wurden HFF-Zellen mit  $5 \times 10^4$  Toxoplasmen infiziert und der Ansatz für eine Auswertung nach 2 Tagen und für eine weitere Analyse nach 3 Tagen mit 37 kBq/well <sup>3</sup>H-Uracil markiert. Nach jeweils 24 h wurde der Testansatz bei -20°C eingefroren, wodurch die Zellmembranen zerstört und die Nukleinsäuren freigesetzt wurden. Für die Messung des inkorporierten <sup>3</sup>H-Uracils wurden die Ansätze aufgetaut und mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf einen Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) übertragen. Der

Filter wurde zum Trocknen für 10 min bei 100°C im Trockenschrank gelagert und anschließend, benetzt mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac), in Plastikfolie eingeschweißt. Die präparierten Filter wurden in einem Beta-Counter ausgewertet. Bei der Messung wurde die, durch einen radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte, Cerenkow-Strahlung erfasst und in *counts per minute* (cmp) berechnet. Die Stärke der Toxoplasmen-Proliferation ergab sich aus der Summe der pro Ansatz errechneten *counts per minute*. Die ermittelten Werte konnten im Anschluss mit dem Computerprogramm GraphPadPrism in Graphform ausgewertet werden.

### 3.6. Sequenzanalyse

Die Analyse von DNA-und Proteinsequenzen erfolgte mit dem Computerprogramm DNASTar (DNASTar, Madison, USA). Sequenzanalysen und Datenbankvergleiche auf Nukleinsäure- sowie Aminosäure-Ebene wurden mit dem BLAST-Search Programm des NCBI (National Center for Biotechnology Information) sowie dem NetPhos 2.0 Sequenz-Analyseprogramm (Center for Biological Sequence Analysis, CBS) durchgeführt. Weiterhin wurde zur Erstellung von Plasmidkarten das Programm Clone Manager 5.0 (Scientific and Educational Software) verwendet. Zum Auffinden bestimmter Motive in der GRA9-Sequenz erfolgte der Abgleich mit bekannten Proteinmotivmustern in der Prosite-Datenbank (ExPasy Molecular Biology Server, Swiss Institute of Bioinformation).

### 3.7. Zellbiologische Arbeitstechniken

#### 3.7.1. Zellkulturmethoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 10 % (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten an der Sterilbank unter Verwendung steriler Ausgangs- oder zuvor autoklavierter Materialien. Die Temperatur-stabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation für 20 min bei 120°C und 2-3 bar autoklaviert. Temperatur-instabile Lösungen wurden dagegen durch Verwendung einer 0,2 µm Membran („Bottle top filter“, Schleicher & Schüll, Dassel) steril filtriert. Vor einer Nutzung wurde das IMDM-Zellkulturmedienum mit 10 % fötalem

Kälberserum supplementiert. Um Komplementproteine in dem Kälberserum zu inaktivieren, wurde das Serum zuvor für 30 min auf 56°C erhitzt.

Verwendete Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert sowie der entstandene Zellkulturabfall jeweils zum Abtöten der Organismen vor der Entsorgung autoklaviert.

### 3.7.2. Kultivierung und Einfrieren von Zelllinien

Als Wirtszelllinie zur Kultivierung von *T. gondii* wurden Vorhaut Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) verwendet. Diese humane Fibroblasten-Zelllinie wächst stark adhärent und bildet stabile Monolayer aus. Bei einem Kontakt mit der Nachbarzelle erfolgt eine Inhibition des Zellwachstums, so dass sich eine konfluente, einschichtige Kultur ausbildet. Da es sich bei den HFF-Zellen um große, flache Zellen mit einer festen Plasmamembran handelt, sind mehrere Zyklen der *T. gondii*-Parasitenvermehrung möglich, bevor es zu Lyse der Wirtszellen kommt. Die Parasiten vermehren sich bis zu einer nahezu vollständigen Lyse der gesamten Wirtszellkultur, so dass hohe Parasitentiter mit geringer Verunreinigung erzielt werden. Aufgrund der stabilen Monolayer können die HFF-Zellen zudem besonders für sensitive Versuche wie die Immunfluoreszenzanalyse oder die Selektion und Klonierung von transfizierten Toxoplasmen herangezogen werden.

Die Kultivierung der HFF-Zellen erfolgte mit oder ohne Infektion in 25 cm<sup>2</sup>- oder 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen im Zellkulturmedium (IMDM, 10 % FCS (v/v), 25 µg/ml Gentamycin) bei 37°C und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 10 % (v/v) CO<sub>2</sub>. Die Zellernte erfolgte nach 3-5 Tagen. Zum Ernten der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und der ausgebildete Monolayer mit PBS gespült. Dem Waschen der Zellen schloss sich eine 5-10-minütige Inkubation mit 5 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank an, um die adhärenenten HFF-Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Die gelösten Zellen wurden mit 10 ml Medium versetzt und die erhaltene Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen (Greiner) bei 1.200 rpm und 4°C für 10 min pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Der resultierende Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5-10 ml Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 50 µl der Zellsuspension in Trypanblau-Lösung aufgenommen (Verdünnung je nach Anzahl 1:2 oder 1:10) und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Durch die ermittelte Zellzahl konnte die Zellsuspension auf eine bestimmte Anzahl Zellen/ml eingestellt und für Zell-Assays genutzt werden.

Zur einfachen Expansion der HFF-Zellen wurde die geerntete Zellsuspension 1:3 verdünnt und in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät. Die in der geernteten Zellkulturflasche zurückgebliebenen Zellen wurden direkt mit 6 ml bzw. 12 ml Zellkulturmedium versetzt und zur Vermehrung der Zellen weiter im Brutschrank gelagert. Für eine Sicherung der angezogenen Zelllinien wurden Gefrierkulturen angelegt. Dafür wurden je ca. 10<sup>7</sup> Zellen in DMSO-Einfrierlösung (Kapitel 3.7.4) aufgenommen, über Nacht bei -80°C gelagert und am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.7.3. *In vitro* Kultivierung und Konservierung

RH-Toxoplasmen, die zur Virulenzgruppe I gehören, wurden in HFF-Zellen kultiviert. Die Parasiten wurden auf einen HFF-Zellmonolayer in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Bei einem Parasit-Wirtszell-Verhältnis von 5:1 resultiert eine vollständige Lyse der Wirtszellen 2 bis 3 Tage nach der Infektion. Die freigesetzten, extrazellulären Tachyzoiten wurden geerntet und mittels 10-minütiger Zentrifugation von verbliebenen Wirtszellbestandteilen getrennt (600 rpm für 10 Minuten). Um die Tachyzoiten aus dem Überstand zu pelletieren, wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 2.800 rpm abzentrifugiert. Die Anzahl der isolierten Tachyzoiten konnte im Anschluss mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt werden. Die komplette Lyse einer konfluenten HFF-Zellkultur einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche führte zu einer Anzahl von ca. 5 x 10<sup>7</sup> bis 1 x 10<sup>8</sup> Tachyzoiten des RH-Stammes. Nach Freisetzung der Parasiten sollte schnellstmöglich eine Weiterkultivierung erfolgen, da freigesetzte Tachyzoiten außerhalb von Wirtszellen absterben.

### 3.7.4. Einfrieren von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten

Zur Sicherung von *T. gondii*-Stämmen wurden infizierte Zellkulturen verwendet. HFF-Zellen wurden in großer Anzahl mit Parasiten infiziert und nach 24-36 h (ca. 8-16 Tachyzoiten pro Vakuole) durch Trypsinierung geerntet. Die abgelösten Zellen wurden in 750 µl DMSO-Einfrierlösung aufgenommen, vorsichtig invertiert und anschließend in ein 1,5 ml Einfrierröhrchen überführt. Die Kultur wurde 24 h bei -80°C gelagert, bevor die Einfrierröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

---

DMSO-Einfrierlösung

FCS 50 %

DMSO 25 %

in IMDM-Medium (gekühlt)

**3.7.5. Auftauen von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten**

Die gefrorenen Parasiten wurden aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37°C im Wasserbad in dem Einfrierröhrchen kurz aufgetaut. Der Inhalt wurde steril in ein 15 ml-Röhrchen (Greiner) überführt, in das zuvor 5 ml kaltes IMDM-Medium vorgelegt wurde. Anschließend wurde der Ansatz bei 2.800 rpm für 10 min bei RT abzentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Die Aufnahme des gewonnenen *T. gondii*-Pellets erfolgte in 10 ml frischem IMDM-Medium. Der Ansatz wurde anschließend auf konfluente HFF übertragen und die Zellkulturflaschen bei 37°C im Brutschrank gelagert.

## 4. Ergebnisse

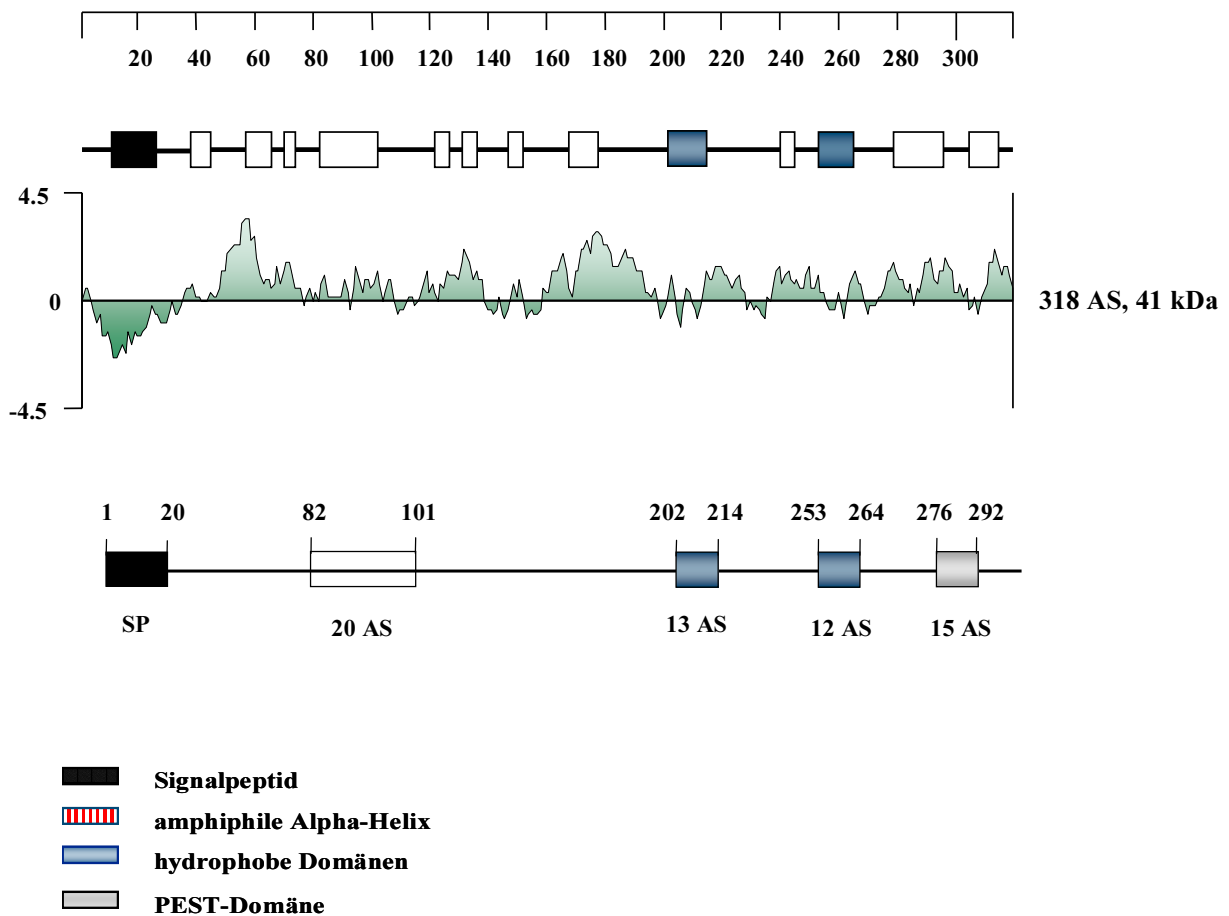
### 4.1. Charakterisierung von GRA9

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde das Protein GRA9 als neues Mitglied der Familie der GRA-Proteine von *T. gondii* identifiziert (Adjogble *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass GRA9, ebenso wie alle bereits bekannten GRA-Proteine, in die Parasitophore Vakuole (PV) sekretiert wird und mit dem membranösen Netzwerk innerhalb der PV sowie der Membran der PV (PVM) assoziiert. Vor diesem Hintergrund erfolgte eine Analyse der GRA9-Sequenz auf spezifische Domänen hin, über die das „Targeting“ von GRA9 in die PV erfolgt bzw. die eine Interaktion mit Membranen innerhalb der PV sowie in den DGs vermitteln könnten.

Der offene Leserahmen des *gra9*-Gens kodiert für ein Protein bestehend aus 318 Aminosäuren (954 Nukleotide), woraus sich eine molare Masse von ca. 41 kDa für GRA9 ergibt. Entsprechend der Analyse des DNA-STAR Sequenz-Analyseprogramms nach Kyte und Doolittle (1982) zur Analyse des hydrophilen und hydrophoben Profils von Proteinen, besitzt GRA9 einen überwiegend hydrophilen Charakter (Abbildung 4.1).

Neben einer hydrophoben Domäne von neunzehn Aminosäuren im N-Terminus von GRA9, die als Signalpeptid für die Sekretion des Proteins fungiert, besitzt GRA9 eine amphiphile Alpha-Helix bestehend aus zwanzig Aminosäuren in Position 82-101 der Aminosäuresequenz. Des Weiteren weist die Sekundärstruktur von GRA9 zwei hydrophobe Alpha-Helices mit einer Größe von dreizehn und zwölf Aminosäuren an Position 202-214 und 253-264 auf, über die eine Anlagerung an membranöse Strukturen erfolgen könnte. Aufgrund ihrer geringen Länge können diese hydrophoben Domänen jedoch nicht als Transmembrandomänen fungieren. Im C-terminalen Sequenzbereich besitzt GRA9 eine Anhäufung von sauren Aminosäuren wie Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T), welche als PEST-Domäne identifiziert wurde (Programm: PEST-Find, Rechsteiner und Rogers, 1996). PEST-Sequenzbereiche sind vermehrt in Proteinen mit kurzer Halbwertszeit zu finden. Für die Proline im PEST-Motiv wird zudem eine Beteiligung an Interaktionen mit anderen Proteinen diskutiert. Die Proteinstruktur von GRA9, inklusive der charakteristischen Domänen ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.



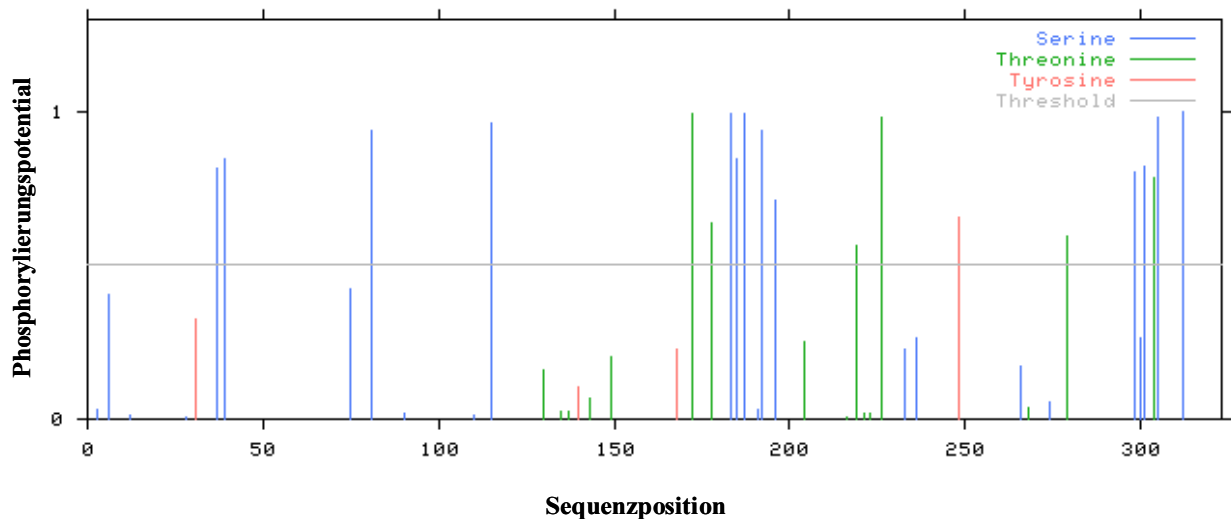


**Abb. 4.1: Darstellung der Aminosäuresequenz sowie der charakteristischen Domänen von GRA9**

Die im Computerprogramm DNASTAR ermittelte Profilanalyse von GRA9 (basierend auf Kyte und Doolittle, 1982) zeigt, dass es sich bei GRA9 um ein überwiegend hydrophiles Protein handelt. Ausschläge oberhalb der Null-Linie weisen auf hydrophile Sequenzbereiche hin, Kurven unterhalb der Null-Linie repräsentieren hydrophobe Sequenzregionen. Die Sekundärstrukturanalyse (nach Chou und Fasman, 1978) zeigt die Existenz eines 19 AS Signalpeptids am N-Terminus (schwarz), einer amphiphilen Alpha-Helix von 20 AS [Position 82-101] (rot), zweier hydrophober Alpha-Helices mit einer Größe von 13 AS und 12 AS [Position 202-214 und 253-264] (blau), sowie einer PEST-Domäne [Position 276-292] (grau) im C-terminalen Bereich des GRA9-Proteins auf.

Die weitere Analyse auf Basis des NetPhos 2.0 Sequenzprogramms, bei dem die GRA9-Proteinsequenz auf mögliche Phosphorylierungsstellen durchsucht wird zeigt, dass in der Sequenz von GRA9 zwanzig putative Phosphorylierungsstellen lokalisiert sind. Die Phosphorylierungsstellen unterteilen sich in dreizehn mögliche Serin-, sechs Threonin- und eine Thyrosin-Phosphorylierungsstelle. In Abbildung 4.2 sind die Phosphorylierungsstellen, sowie ihre Lokalisation im GRA9-Protein dargestellt. Über die gesamte Sequenz von GRA9

sind lediglich vier der zwanzig Phosphorylierungsstellen im vorderen Sequenzbereich des Proteins lokalisiert. Die restlichen sechzehn Stellen wurden im mittleren, sowie im C-terminalen Bereich der GRA9-Sequenz ermittelt. Die GRA9-Sequenzanalyse lieferte weiterhin vier putative Motive für eine N-Glycosylierung, sowie eine N-Myristylierungsstelle.



**Abb. 4.2: Phosphorylierungsstellen von GRA9**

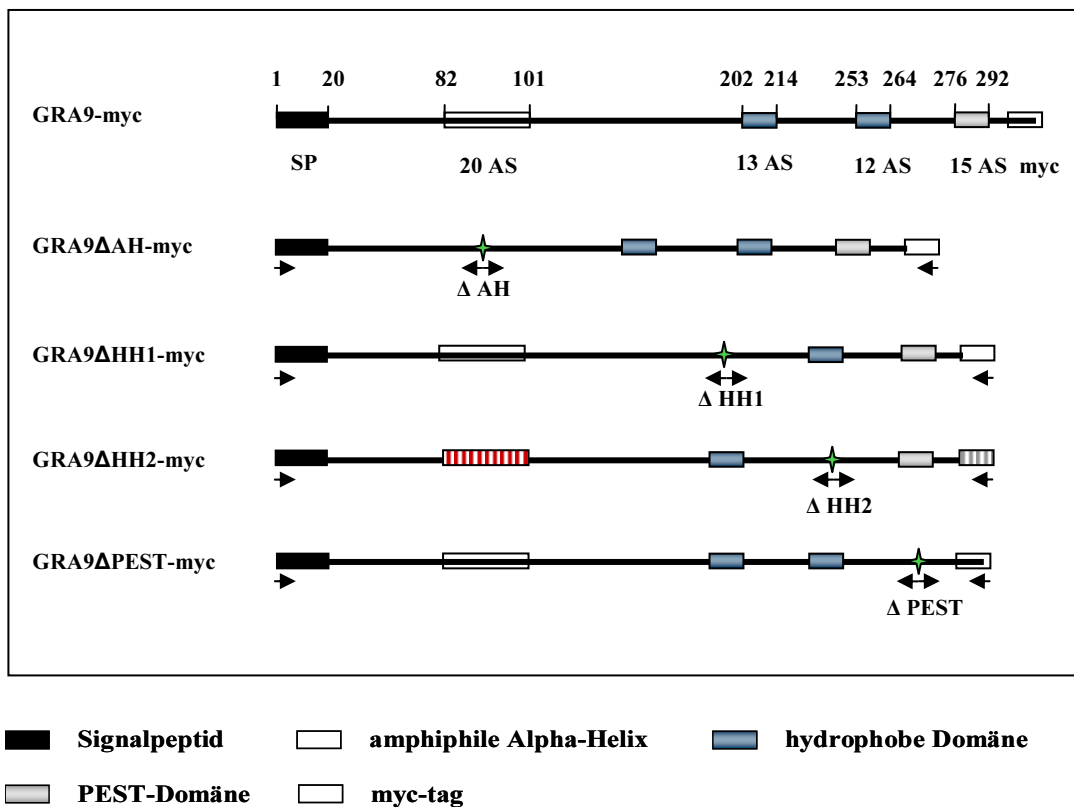
Mit Hilfe des NetPhos 2.0 Daten-Analyseprogramms wurden für GRA9 zwanzig potentielle Phosphorylierungsstellen vorausgesagt, die sich in dreizehn mögliche Serin-Phosphorylierungsstellen (blau), sechs vorausgesagte Threonin-Phosphorylierungsstellen (grün) und eine wahrscheinliche Tyrosin-Phosphorylierungsstelle (rot) unterteilen.

## 4.2. Funktionsanalyse von charakteristischen Domänen innerhalb der GRA9-Sequenz

Wie beschrieben, weist GRA9 mehrere putative Sequenzdomänen auf, die für eine Interaktion des Proteins mit anderen sekretorischen Proteinen oder mit membranösen Strukturen verantwortlich sein könnten. Aus der Literatur ist bekannt, dass GRA-Proteine über hydrophobe Bereiche und amphiphile Alpha-Helices untereinander und zusätzlich mit membranösen Strukturen interagieren. Daher sollte zunächst die funktionelle Bedeutung dieser Domänen durch Analyse von GRA9-Deletionsmutanten näher untersucht werden.

#### 4.2.1. Konstruktion von GRA9-Deletionsmutanten

Zur funktionellen Analyse definierter Proteinbereiche im GRA9-Protein wurden zunächst insgesamt vier GRA9-Deletionskonstrukte hergestellt. Das erste Konstrukt zeichnet sich durch die Deletion der zwanzig Aminosäuren-umfassenden amphiphilen Alpha-Helix in Position 82-101 aus. In drei weiteren Konstrukten wurde das GRA9-Protein jeweils um eine der beiden hydrophoben Domänen, die einen Sequenzbereich von dreizehn bzw. zwölf Aminosäuren umspannen [Position 202-214 und Position 253-264], sowie um die, am C-Terminus lokalisierte PEST-Domäne deletiert. Um die GRA9-Deletionskonstrukte in Toxoplasmen nachweisen zu können, wurde C-Terminal ein myc-Tag angefügt. Die folgende Abbildung stellt die konstruierten GRA9-myc-Deletionsmutanten schematisch dar.



**Abb. 4.3: Schematische Darstellung der deletierten GRA9-myc-Konstrukte**

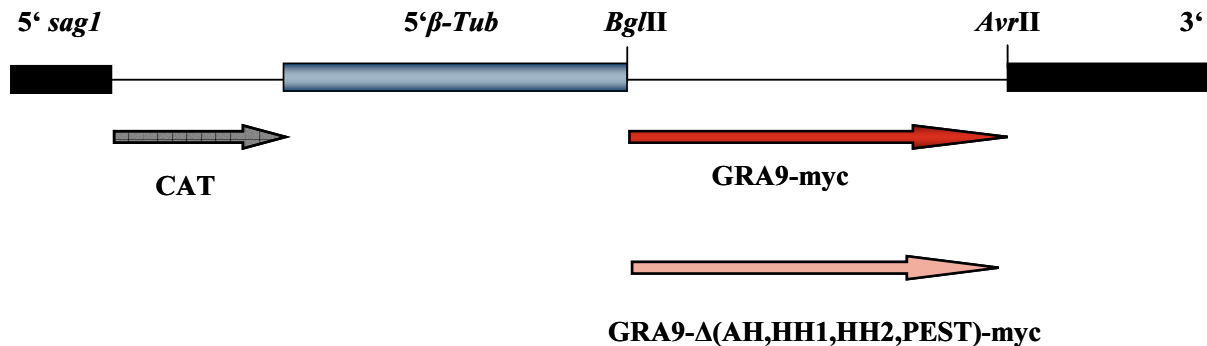
Die Abbildung zeigt die konstruierten GRA9-myc-Deletionskonstrukte einschließlich der verwendeten Primer-Positionen. Des Weiteren ist die Struktur des kompletten GRA9-myc-Proteins dargestellt. Das abgebildete GRA9-myc Konstrukt dient in allen folgenden Ansätzen als Kontrolle.

Zur Klonierung der deletierten GRA9-Fragmente wurden die entsprechenden PCR-Produkte mit spezifischen „Primern“ generiert (s. Abb. 4.3). Durch die C- und N-terminal liegenden Primer, wurde an das 5'-Ende der GRA9-Sequenz eine *Bgl*II-Schnittstelle sowie an das 3'-Ende eine *Avr*II-Schnittstelle an die amplifizierte cDNA anfügt. Des Weiteren wurden die Konstrukte mit einem myc-Epitop am C-Terminus fusioniert. Die Sequenzinformation des „myc-tags“ wurde über den 3'-Primer geliefert. Durch in der GRA9-Sequenz liegende Primer, die den jeweils zu deletierenden Sequenzbereich flankieren, wurden durch Verwendung des entsprechenden C- bzw. N-terminalen Gegen-Primers, Einzelfragmente von GRA9 amplifiziert, die durch anschließende Ligation verknüpft wurden. Um eine Ligation der Einzelfragmente zu ermöglichen, wurden die amplifizierten PCR-Produkte mit Polynukleotidkinase an den 5'-Enden phosphoryliert, um überhängende Phosphatreste für eine Ligation zur Verfügung zu stellen. Auf diese Weise wurden GRA9-myc-Mutanten mit deletierter Alpha-Helix, fehlenden hydrophoben Domänen oder deletierter PEST-Domäne konstruiert. Die Überexpression von GRA9-myc bzw. der GRA9-myc-Deletionsmutanten in RH-Toxoplasmen wurde durch eine Transfektion erzielt. Als Expressionsvektor diente das Plasmid pTub-myc. Die ligierten GRA9-Gesamtfragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Avr*II und *Bgl*II restringiert und in den Vektor pTub-myc kloniert, welcher zuvor ebenfalls mit *Bgl*II/*Avr*II linearisiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Im Vektor pTub-myc stehen die GRA9-myc-Fusionsproteine unter Kontrolle eines starken  $\beta$ -*Tubulin*-Promotors ( $\beta$ -*Tub*) von *T. gondii*, wodurch die starke Transkription des jeweiligen Gens ermöglicht wird. Ferner trägt der Vektor eine Chloramphenicol-Resistenz als Selektionsmarker unter der Kontrolle eines *sagI*-Promotors (Abbildung 4.4).

Das konstruierte GRA9 $\Delta$ AH-myc-Fragment besitzt mit 924 bp eine Größe von 38,2 kDa, während das GRA9 $\Delta$ HH1-myc-Fragment eine Größe von 39,4 kDa aufweist (945 bp). Die Fragmente GRA9 $\Delta$ HH2-myc und GRA9 $\Delta$ PEST-myc kodieren dagegen für ein 39,5 kDa (948 bp) und ein 39,2 kDa (939 bp) großes Protein.

Nach Transformation von kompetenten *E. coli* JM109-Zellen und Selektion auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten wurden die jeweils angewachsenen Klone nach DNA-Plasmid-Minipräparation mittels Restriktionsverdau und GATC-Sequenzanalyse auf erfolgreiche Insertion des PCR-Fragments hin analysiert.



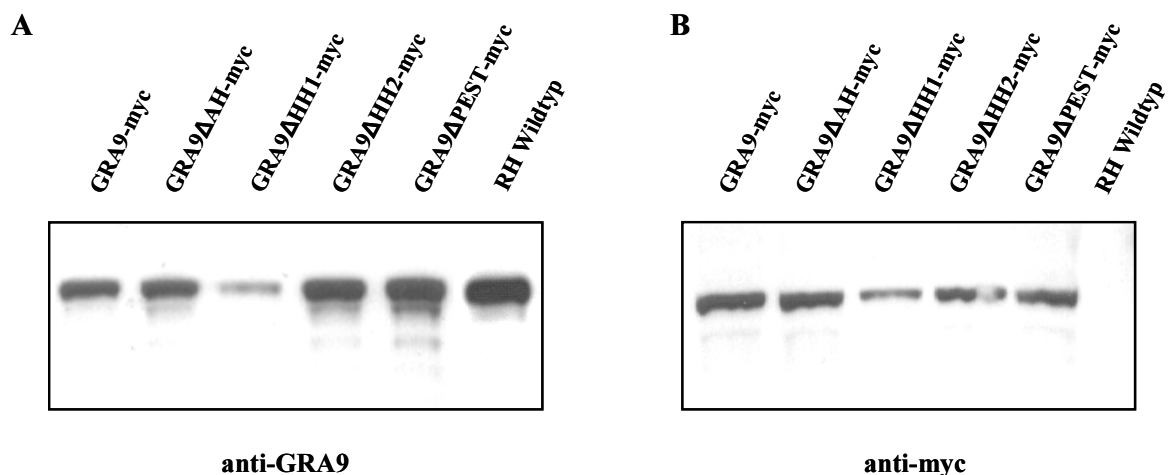
**Abb. 4.4: Konstruktion der Expressionsvektoren pTub-GRA9-myc sowie pTub-GRA9ΔAH-myc, pTub-GRA9ΔHH1-myc, pTub-GRA9ΔHH2-myc und pTub-GRA9ΔPEST-myc**

Eine Überexpression von GRA9 sowie der GRA9-Deletionsmutanten in RH-Tachyzoiten von *T. gondii* wird durch Transfektion mit dem Expressionsvektor pTUB-myc erzielt. Die cDNA Sequenzen im GRA9-myc- (rot) bzw. GRA9ΔAH-myc-, GRA9ΔHH1-myc-, GRA9ΔHH2-myc- und GRA9ΔPEST-myc-Plasmid (hellrot) stehen unter Kontrolle eines  $\beta$ -Tubulin-Promotors ( $\beta$ -Tub). Die Transkription von *cat* (grauer Pfeil) wird über den Promotor *sag1* reguliert.

#### 4.2.2. Expression der GRA9-myc-Deletionsmutanten in *Toxoplasma gondii*

Die klonierten GRA9-Deletionsmutanten in dem Vektor pTub-myc wurden mittels Elektroporation in *T. gondii* eingebracht. Im Rahmen der Elektroporation wurden je  $1 \times 10^8$  RH-Tachyzoiten mit 70  $\mu$ g pTub-GRA9-myc- bzw. pTub-GRA9-ΔAH-myc-, pTub-GRA9-ΔHH1-myc-, pTub-GRA9-ΔHH2-myc- oder pTub-GRA9-ΔPEST-myc-Expressionsplasmid transfiziert. Zum Nachweis einer Expression der myc-markierten GRA9-Fusionsproteine in RH-Tachyzoiten wurden aus frisch lysierten Parasiten ( $10^9$  Toxoplasmen) der Stämme RH, RH-GRA9-myc, RH-GRA9-ΔAH-myc, RH-GRA9-ΔHH1-myc, RH-GRA9-ΔHH2-myc und RH-GRA9-ΔPEST-myc Lysate hergestellt (Toxoplasma-Lysat-Antigene (TLA)). Die *T. gondii*-Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die modifizierten Proteine durch GRA9-Antiserum sowie anti-myc-Antikörper nachgewiesen. Für die Analyse wurden pro Spur des SDS-Gels ca. 7  $\mu$ g Protein aufgetragen. Wie in Abbildung 4.5 A gezeigt, konnte durch Verwendung des GRA9-Antiserums in allen RH-GRA9-myc-, RH-GRA9-ΔAH-myc-, RH-GRA9-ΔHH1-myc-, RH-GRA9-ΔHH2-myc- und RH-GRA9-ΔPEST-Lysaten eine Bande auf einer Höhe von ca. 40 kDa detektiert werden. Da die GRA9-Fusionskonstrukte jedoch in Wildtyp-Tachyzoiten eingebracht wurden, wird neben der Detektion der GRA9-

Fusionsproteine, überlagernd zusätzlich das endogen in den Toxoplasmen vorliegende native GRA9 nachgewiesen. Aufgrund dessen erfolgt der spezifische Nachweis der GRA9-myc-Deletionsmutanten in RH-Tachyzoiten über die Detektion des myc-Epitops. Abbildung 4.5 B stellt die Detektion der myc-Tag-Fusionsproteine nach Inkubation des Western-Blots mit anti-myc-Antikörpern dar. Die Analyse zeigt sowohl für das GRA9-myc-Fusionsprotein, als auch für die GRA9-myc-Deletionsmutanten eine Bande auf einer Höhe von ca. 40 kDa. Aufgrund der sehr kleinen Deletionsbereiche um zwanzig Aminosäuren für die amphiphile Alpha-Helix sowie dreizehn bzw. zwölf Aminosäuren für die hydrophoben Domänen und fünfzehn Aminosäuren für die PEST-Region, sind kaum ersichtliche Größenunterschiede zwischen dem GRA9-myc-Fusionsprotein und den verschiedenen GRA9-myc-Deletionskonstrukten im Immunoblot zu detektieren.



**Abb. 4.5: Expression von GRA9-myc-, GRA9-ΔAH-myc-, GRA9-ΔHH1-myc-, GRA9-ΔHH2-myc- und GRA9-PEST-myc-Fusionsproteinen in *T. gondii* RH-Tachyzoiten**

Zur Analyse einer erfolgreichen Expression der transfizierten GRA9-Fusionsplasmide in *T. gondii*, wurden 12 µl der isolierten *T. gondii*-Lysate ( $1 \times 10^9$  Toxoplasmen) in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die GRA9-myc-Fusionsproteine über Western-Blot-Analyse immunologisch durch (A) GRA9-Serum (1:1000) sowie (B) spezifische anti-myc-Antikörper (1:500) detektiert. Als Kontrolle wurde ein Lysat von RH-Wildtyp Toxoplasmen verwendet.

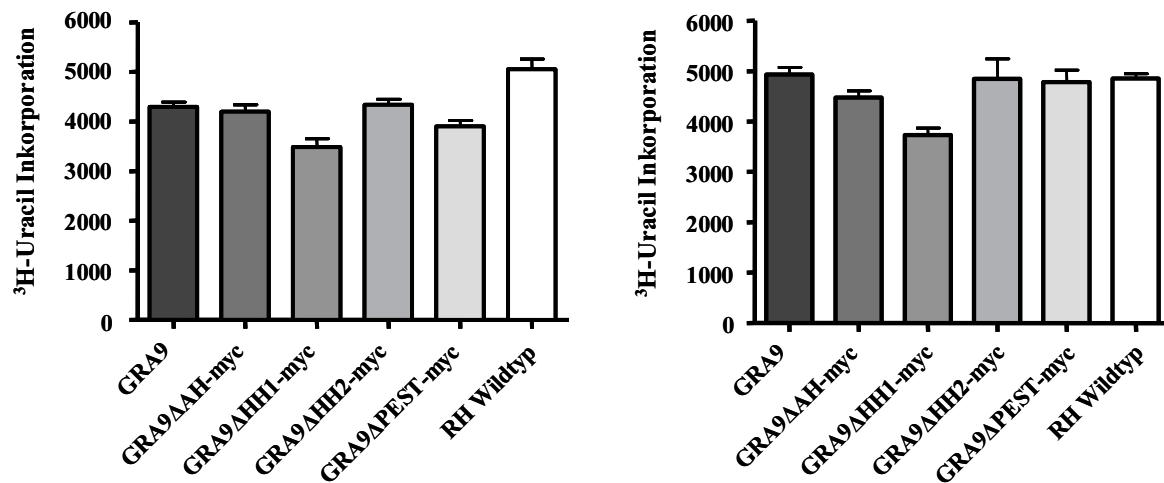
Um zu überprüfen, ob es sich bei den detektierten Banden um einen spezifischen Nachweis des angefügten myc-Epitops handelt, wurde als Negativkontrolle *T. gondii*-Lysat des RH-Wildtyps mitgeführt. Erwartungsgemäß erfolgte keine Detektion eines myc-spezifischen Signals in dem Lysat von Wildtyp-Toxoplasmen. Der Nachweis der spezifischen Signale mit GRA9-Antiserum und mit anti-myc-Antikörpern im Immunoblot beweist, dass die GRA9-

Fusionsproteine GRA9-myc, GRA9-ΔAH-myc, GRA9-ΔHH1-myc, GRA9-ΔHH2-myc und GRA9-ΔPEST-myc in RH-Tachyzoiten exprimiert werden. Über die, auf dem Transfektionsplasmid enthaltene Chloramphenicol-Resistenz wurden die Transfektanten selektioniert.

#### 4.2.3. Wachstumsbestimmungen von RH-GRA9-myc und RH-GRA9-myc-Deletionsmutanten

Um zu analysieren, ob die Expression der modifizierten GRA9-Proteine einen Einfluss auf das Wachstum von *T. gondii*-Tachyzoiten ausübt, wurde die Proliferation der Parasiten mittels der <sup>3</sup>H-Uracil-Inkorporationsmethode bestimmt. Dafür wurden HFF-Zellen („human foreskin fibroblasts“) mit 5 x 10<sup>4</sup> Toxoplasmen infiziert und der Ansatz nach 36 und nach 48 Stunden mit <sup>3</sup>H-Uracil markiert. Dabei wurde das <sup>3</sup>H-Uracil jeweils 24 Stunden vor Beendigung der Parasitenkultur zugegeben. Im Gegensatz zu seiner Wirtszelle ist *Toxoplasma gondii* befähigt, <sup>3</sup>H-markiertes Uracil in seine RNA einzubauen. Aufgrund einer 100-fach erhöhten Aktivität des Enzyms Uridin-Phosphorylase können Toxoplasmen, im Gegensatz zu ihrer Wirtszelle, externes Uracil direkt für die Nukleotidsynthese heranziehen (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977). Die Erfassung der Radioaktivität, und somit des in die Nukleinsäuren des Parasiten inkorporierten <sup>3</sup>H-Uracils, steht dabei im direkten Zusammenhang zur Proliferation der *T. gondii*-Tachyzoiten. Die Messung der <sup>3</sup>H-Uracil-Aufnahme erfolgte in „counts per minute“ (cmp).

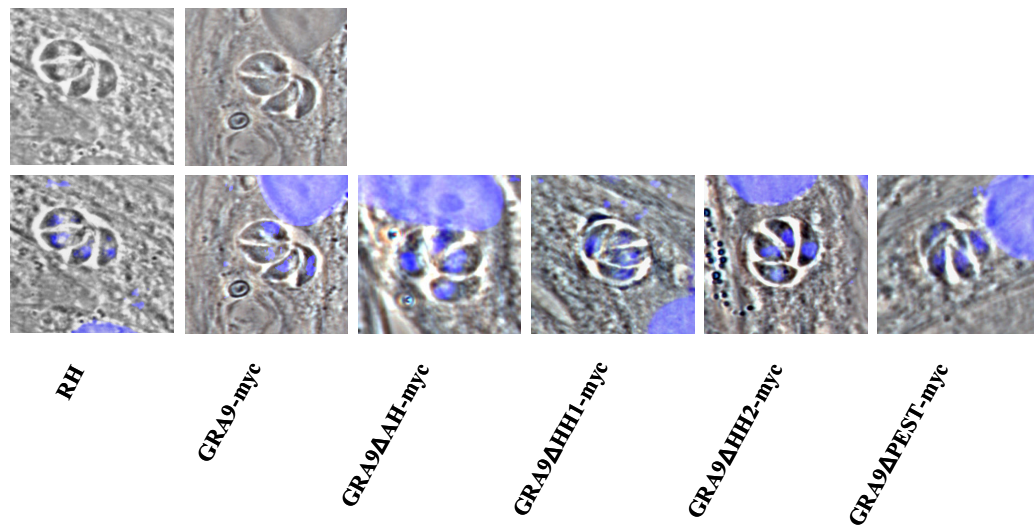
Abbildung 4.6 zeigt die Inkorporation des <sup>3</sup>H-Uracils nach 36 bzw. 48 Stunden Tachyzoitenwachstum. Es wurde keine signifikante Änderung im Proliferationsverhalten der GRA9-myc-Fusionsmutanten im Vergleich zu reinen RH-Wildtyp-Tachyzoiten ermittelt. Das Wachstum der GRA9-ΔAH-myc-, GRA9-ΔHH1-myc-, GRA9ΔHH2-myc- und GRA9ΔPEST-myc-Mutanten ist nur geringfügig, aber nicht signifikant schwächer als das der GRA9-myc-Fusionsproteine sowie der Wildtyp-Tachyzoiten. Nach diesen Daten ist ein Einfluss der, in RH-Tachyzoiten exprimierten GRA9-myc-Fusionsproteine auf das Wachstum von *T. gondii* auszuschließen.



**Abb. 4.6: Unveränderte *in vitro*-Proliferation von RH-GRA9-myc-, RH-GRA9ΔAH-myc-, RH-GRA9ΔHH1-myc-, RH-GRA9ΔHH2-myc- und RH-GRA9ΔPEST-myc-Toxoplasmen in HFF-Zellen**  
HFF-Wirtszellen wurden in 96-er-well-Platten mit  $5 \times 10^4$  RH-Toxoplasmen sowie mit  $5 \times 10^4$  RH-GRA9-myc-, RH-GRA9ΔAH-myc-, RH-GRA9ΔHH1-myc-, RH-GRA9ΔHH2-myc- bzw. RH-GRA9ΔPEST-myc-Toxoplasmen infiziert. Zur Bestimmung der Proliferation von *T. gondii* wurden die Ansätze nach 12 (Grafik links) bzw. nach 24 Stunden (Grafik rechts) für weitere 24 Stunden mit 37 kBq/well <sup>3</sup>H-Uracil markiert. Die Daten sind angegeben als *counts per minute* (Mittelwert +/- Standardabweichung als 3-fach Bestimmung).

Zusätzlich zur Analyse des Tachyzoitenwachstums auf Basis der <sup>3</sup>H-Uracil-Inkorporationsmethode wurde orientierend das phänotypische Wachstumsverhalten der *T. gondii*-Tachyzoiten untersucht. Dazu wurden HFF-Wirtszellen mit RH-GRA9-myc-Tachyzoiten bzw. den RH-GRA9ΔAH-myc-, GRA9ΔHH1-myc-, GRA9ΔHH2-myc- und GRA9ΔPEST-myc-Tachyzoiten für 24 Stunden infiziert und die Morphologie der ausgebildeten *T. gondii*-Rosetten in Phasenkontrastanalysen unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Zur besseren Darstellung der intrazellulären Parasiten wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt, bei der spezifisch die DNA der Wirtszellen und der Parasiten angefärbt wird. Durch die Anfärbung können die Zellkerne der Wirtszelle und der Parasiten somit genauer lokalisiert werden. Wie in Abbildung 4.7 dargestellt, zeigt die phänotypische Wachstumsanalyse keine signifikante Veränderung des Tachyzoitenwachstums der gentechnisch veränderten RH-Tachyzoiten.





**Abb. 4.7: Unveränderte Morphologie intrazellulärer GRA9-myc-Mutanten in HFF-Zellen**

HFF-Zellen wurden für 24 Stunden mit RH-Parasiten bzw. RH-GRA9-myc-Mutanten infiziert, mit 3 % Paraformaldehyd/PBS fixiert und die DNA im Zellkern durch Interkalation mit DAPI angefärbt. Zum Vergleich ist bei RH- und RH-GRA9-Tachyzoiten der Phasenkontrast ohne DAPI-Färbung mit aufgeführt.

Die verschiedenen RH-Klone wiesen nach 24 Stunden morphologisch identische *T. gondii*-Rosetten, bestehend aus vier Tachyzoiten, auf. Der Vergleich der RH-GRA9-myc-Mutanten mit den RH-Wildtyp-Tachyzoiten zeigte zudem keinen negativen Effekt auf die Ausbildung der Parasitophoren Vakuole. Wie deutlich im Phasenkontrast zu sehen, umschließt die PV, als abgrenzendes Organell zur Wirtszelle, die RH-Tachyzoiten sowie die RH-GRA9-myc-Mutanten vollständig.

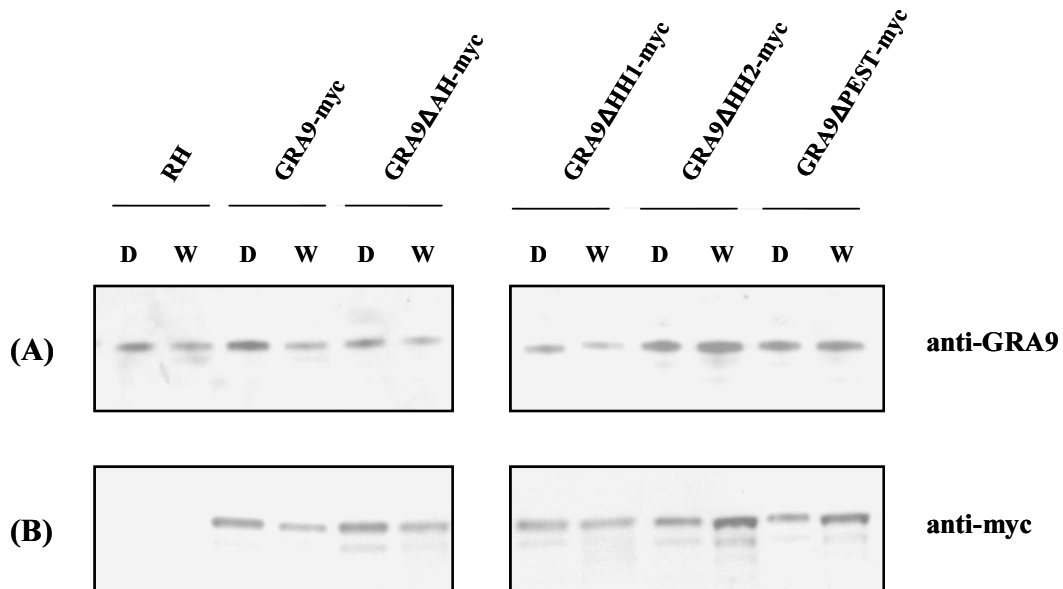
#### 4.3. Nachweis der GRA9-myc-Fusionsproteine in den Dichten-Granula von *Toxoplasma gondii*

Vor der Sekretion in die Parasitophore Vakuole liegen die GRA-Proteine von *T. gondii* angereichert in den Dichten-Granula vor. Aus Vorbefunden ist bekannt, dass das native GRA9 in den Dichten-Granula in löslicher Form und als aggregiertes Protein existiert. Um zu analysieren, ob durch Deletion der amphiphilen Alpha-Helix, der hydrophoben Domänen oder der PEST-Domäne, das Löslichkeitsverhalten des, laut Sequenzanalyse zu 72 % löslichen GRA9-Proteins beeinflusst wird, wurde eine Triton-X-114-Partitionierung durchgeführt. Dabei werden die Proteine aufgrund ihrer Affinität für hydrophile oder hydrophobe Umgebungen aufgetrennt.

Für die Analyse wurden extrazelluläre Tachyzoiten des Wildtyps, sowie der stabilen RH-GRA9-myc-Mutante und der RH-GRA9-myc-Deletionsmutanten, mechanisch aufgebrochen und das resultierende *T. gondii*-Lysat mit Triton-X-114 versetzt. Zur Gewinnung des *T. gondii*-Lysats wurden frisch geerntete Tachyzoiten verwendet. Das Lysat von  $1 \times 10^9$  Toxoplasmen wurde in einem Milliliter PBS aufgenommen und mit 200  $\mu$ l Triton-X-114 bei 4°C gemischt. Triton-X-114 ist eine Seife, die in wässrigem Milieu Mizellen ausbildet. Mit Erhöhung der Temperatur nimmt die Mizellengröße exponentiell zu, wodurch die mit den Mizellen aggregierten Proteine von freien Proteinen getrennt werden können. Da die Mizellengröße temperaturabhängig ist, wurden die *T. gondii*-Lysate auf 30°C erwärmt. Durch eine anschließende Zentrifugation wurde die Triton-X-114-reiche Phase, die die aggregierten Proteine enthält, von der Triton-X-114-armen Phase mit den freien Proteinen getrennt (Bordier, 1981).

Abbildung 4.8 A zeigt, dass das GRA9-Protein innerhalb der Dichten-Granula von RH-Tachyzoiten in der Detergenzphase (D) sowie in der wässrigen Phase (W) im Immunoblot auf Höhe von ca. 40 kDa detektiert werden kann. Der Nachweis des Proteins in beiden Phasen bestätigt die Vorbefunde bezüglich der GRA9-Verteilung als aggregiertes sowie als freies Protein in den Dichten-Granula (Adjogble *et al.*, 2004). Wie im Wildtyp wurde auch das Fusionsprotein GRA9-myc als lösliches Protein in der wässrigen und in der detergenten Phase detektiert. Beide Proteine scheinen jedoch stärker in der detergenten Phase vorhanden zu sein. Ein ähnliches GRA9-Verteilungsmuster wurde auch für die GRA9 $\Delta$ AH-myc-Mutante sowie für die übrigen GRA9-myc-Deletionsmutanten nachgewiesen. Es konnten jedoch leichte quantitative Unterschiede festgestellt werden. Während GRA9 in den Mutanten GRA9 $\Delta$ AH-myc und GRA9 $\Delta$ HH1-myc ähnlich wie der Wildtyp leicht verstärkt in der detergenten Phase zu finden war, ließ sich GRA9 in den GRA9 $\Delta$ HH2-myc- und GRA9 $\Delta$ PEST-myc-Mutanten gleichmäßig in beiden Phasen detektieren. Im Rahmen der anti-GRA9-Detektion wurde jedoch zusätzlich zu den modifizierten Proteinen auch das endogene GRA9 nachgewiesen. Durch die Analyse mit anti-myc-spezifischen Antikörpern (Abbildung 4.8 B) konnte die Verteilung der GRA9-myc-Fusionsproteine spezifisch detektiert werden. So können mögliche Löslichkeitsveränderungen genauer bestimmt werden.

In der folgenden Abbildung 4.8 B ist eine solche Analyse mit anti-myc-Antikörpern dargestellt.



**Abb. 4.8: Löslichkeit von GRA9-, GRA9-myc-, GRA9ΔAH-myc-, GRA9ΔHH1-myc-, GRA9ΔHH2-myc- und GRA9ΔPEST-myc-Proteinen in den Dichten-Granula von *T. gondii***

Extrazelluläre RH-Tachyzoiten sowie RH-GRA9-myc-, RH-GRA9ΔAH-myc-, RH-GRA9ΔHH1-myc-, RH-GRA9ΔHH2-myc- und RH-GRA9ΔPEST-myc-Mutanten wurden mechanisch aufgebrochen und das gewonnene *T. gondii*-Lysat ( $1 \times 10^9$  Toxoplasmen/ml) mit Triton-X-114 behandelt. Durch Inkubation mit Triton-X-114 wurden die enthaltenen Proteine aufgrund ihrer Affinität zur hydrophilen bzw. hydrophoben Umgebung getrennt. Die Triton-X-114-Fraktionen wurden in einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit GRA9-Antiserum (A) und anti-myc-Antikörpern (B) detektiert.

In der RH-Wildtyp-Kontrolle konnte erwartungsgemäß kein myc-spezifischer Nachweis erfolgen. Aufgrund des ausbleibenden Signals in der Negativkontrolle konnten unspezifische Reaktionen ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 4.8 B ersichtlich, wird das myc-Epitop des GRA9-myc-Fusionsproteins und der GRA9-myc-Deletionsmutanten in der wässrigen und in der detergenten Phase detektiert. Die Existenz der mutierten Proteine GRA9ΔAH-myc, GRA9ΔHH1-myc, GRA9ΔHH2-myc und GRA9ΔPEST-myc in der wässrigen und in der detergenten Phase beweist, dass die Elimination einer einzigen Region das Lösungsverhalten des GRA9-Proteins nicht vollständig ändert.

Die genaue Analyse des Verteilungsmusters zeigte jedoch Unterschiede in der Intensität der detektierten Signale. So wurden die Proteine GRA9ΔHH1-myc, GRA9ΔHH2-myc und GRA9ΔPEST-myc mit den anti-myc-spezifischen Antikörpern leicht verstärkt in der wässrigen

Phase detektiert, was auf eine geringfügige Zunahme der Hydrophilie hindeutet. Im Vergleich dazu war das Protein GRA9 $\Delta$ AH-myc, ebenso wie das GRA9-myc-Protein, leicht vermehrt in der detergenten Phase nachweisbar.

#### **4.4. Lokalisation des GRA9-myc-Fusionsproteins und der GRA9-myc-Deletionsmutanten in der Parasitophoren Vakuole von *Toxoplasma gondii***

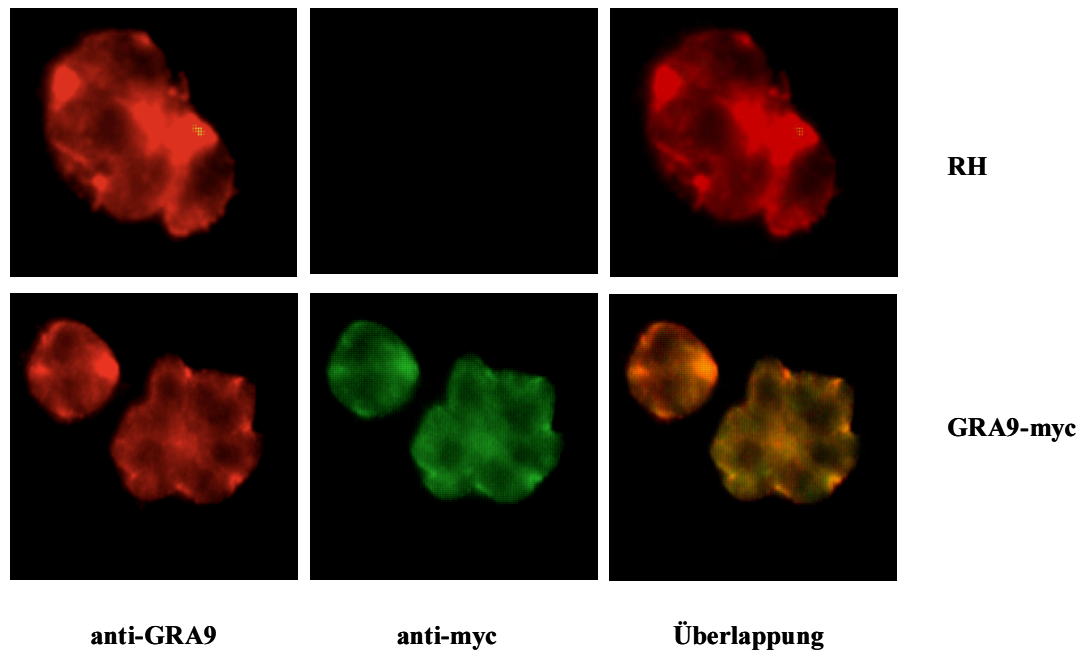
Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich subzelluläre Lokalisationen von Proteinen nachweisen. Diese können Rückschlüsse auf unbekannte Funktionen des Proteins liefern. Dabei ist bekannt, dass GRA9 innerhalb der Parasitophoren Vakuole sowohl in den Tachyzoiten als auch im Lumen der Vakuole nachweisbar ist. Um zu analysieren, ob die amphiphile Alpha-Helix oder die hydrophoben Domänen, die Lokalisierung des GRA9-Proteins innerhalb der Parasitophoren Vakuole beeinflussen, wurden die bereits beschriebenen GRA9-Mutanten verwendet. Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden HFF-Wirtszellen für 24-36 Stunden mit Tachyzoiten infiziert, mit 3 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und einem Fluoreszenznachweis mit anti-GRA9-Antiserum, sowie den anti-myc-spezifischen Antikörpern, unterzogen. Als Sekundärantikörper wurden cy<sup>3</sup>- und cy<sup>2</sup>-markierte Antikörper verwendet. Cy<sup>3</sup> richtet sich gegen Kaninchen-IgG/ -IgM und wird bei der Detektion von GRA9 angewendet. Cy<sup>2</sup>-markierte Antikörper erkennen Maus-IgG/ -IgM und werden beim Nachweis des myc-Epitops in der Immunfluoreszenz eingesetzt.

Wie das Ergebnis der Analyse mit GRA9-Serum in Abbildung 4.9 zeigt, lag das GRA9-Protein in RH-Wildtyp-Tachyzoiten 24-36 h nach Infektion von HFF-Zellen, wie erwartet, in der Parasitophoren Vakuole und zu geringen Teilen im Zytosol des Parasiten vor. Der Nachweis mit spezifischen anti-myc-Antikörpern führte aufgrund der fehlenden myc-Expression in RH-Wildtyp-Tachyzoiten erwartungsgemäß zu keinem nachweisbaren Fluoreszenzsignal.

Als Kontrolle wurden stabile GRA9-myc-Toxoplasmen verwendet. Das Verteilungsmuster des GRA9-myc-Fusionsproteins innerhalb der PV und im Zytosol der Tachyzoiten entsprach der Lokalisation des endogenen GRA9-Proteins in RH-Wildtyp-Tachyzoiten.

Die Überlagerung des GRA9- und des myc-Fluoreszenzsignals zeigte eine exakte Co-Lokalisation in den RH-GRA9-myc-Tachyzoiten, wodurch auf eine homogene Verteilung das endogenen GRA9- und des GRA9-myc-Proteins in der PV zu schließen ist. Das Ergebnis legt

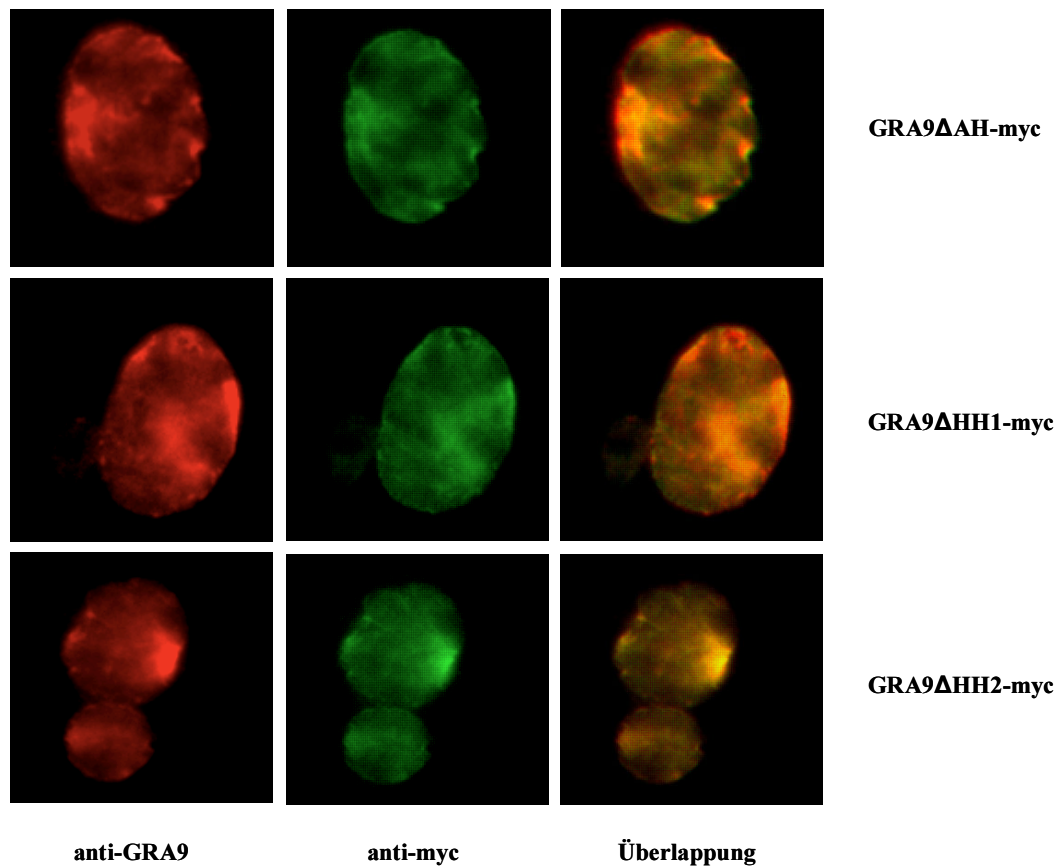
außerdem nahe, dass die Fusion des GRA9-Proteins mit dem myc-Epitop keinen Einfluss auf das Lokalisationsverhalten des nativen GRA9-Proteins nimmt.



**Abb. 4.9: Identische Expression von GRA9 und GRA9-myc in RH-Toxoplasmen**

Immunfluoreszenznachweis der GRA9- und GRA9-myc-Expression in der Parasitophoren Vakuole von *T. gondii*. HFF-Wirtszellen wurden für 24-36 Stunden mit RH-Tachyzoiten bzw. RH-GRA9-myc-transfizierten Parasiten infiziert. Die Paraformaldehyd-fixierten Präparate wurden anschließend mit anti-GRA9-Antiserum bzw. spezifischen anti-myc-Antikörpern behandelt und einem Fluoreszenznachweis unterzogen. Die Detektion erfolgte mit cy<sup>3</sup>- (anti-Kaninchen, rot) und cy<sup>2</sup>- (anti-Maus, grün) markierten Sekundärantikörpern.

Um zu analysieren, ob die hydrophoben Sequenzbereiche bzw. die amphiphile Helix einen Einfluss auf das GRA9-„Targeting“ und das Lokalisationsverhalten von GRA9 innerhalb der PV besitzen, wurde ebenfalls die Expression der Fusionsproteine GRA9 $\Delta$ AH-myc, GRA9 $\Delta$ HH1-myc und GRA9 $\Delta$ HH2-myc in der Immunfluoreszenzanalyse mikroskopisch ausgewertet. Wie in Abbildung 4.10 gezeigt, wiesen alle drei GRA9-myc-Deletionsmutanten eine Lokalisation des myc-Fluoreszenzsignals in der Parasitophoren Vakuole und zu geringen Teilen im Zytoplasma des Parasiten auf. Das Verteilungsmuster der myc-markierten GRA9-Deletionsproteine entsprach dabei der Verteilung des myc-Epitops in dem GRA9-myc-Ausgangskonstrukt (Abbildung 4.9).



**Abb. 4.10: Unverändertes GRA9-Verteilungsmuster in den GRA9ΔAH-myc-, GRA9ΔHH1-myc- und GRA9ΔHH2-myc-Deletionsmutanten**

Immunfluoreszenzanalyse der GRA9- sowie der myc-Expression in intrazellulären GRA9ΔAH-myc-, GRA9ΔHH1-myc- und GRA9ΔHH2-myc-RH-Tachyzoiten. HFF-Wirtszellen wurden für 24-36 Stunden mit Tachyzoiten des entsprechenden Stammes infiziert und nach Fixierung mit Paraformaldehyd mit anti-GRA9-Serum bzw. spezifischen anti-myc-Antikörpern inkubiert. Die Detektion erfolgte mit  $\text{cy}^3$ - (anti-Kaninchen, rot) und  $\text{cy}^2$ - (anti-Maus, grün) markierten Sekundärantikörpern.

Die vollständige Überlagerung der GRA9- und der myc-Fluoreszenzsignale zeigte eine exakte Co-Lokalisation beider Signale in den GRA9ΔAH-myc-, GRA9ΔHH1-myc- und GRA9ΔHH2-myc-Mutanten. Die erzielten Befunde liefern erste Hinweise darauf, dass das „Targeting“ von GRA9 innerhalb der Parasitophoren Vakuole unabhängig von der zwanzig Aminosäuren umfassenden Alpha-Helix bzw. den hydrophoben Domänen (dreizehn und zwölf Aminosäuren) von GRA9 erfolgt.

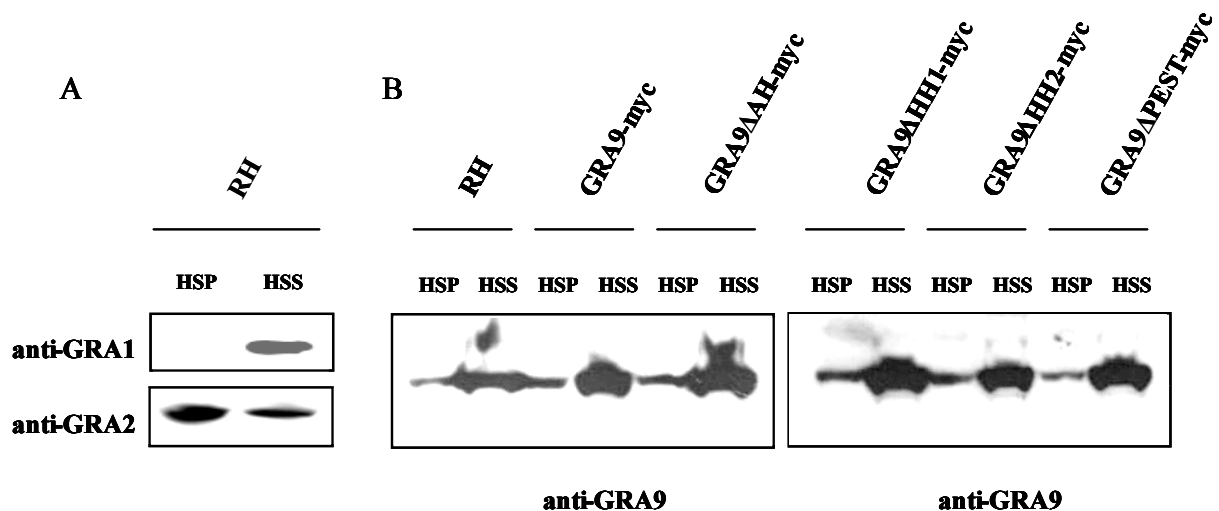
#### 4.5. Analyse der subzellulären Verteilung der deletierten GRA9-myc-Fusionsproteine

Wie in Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt, sind sowohl das native GRA9-myc-Protein, als auch die GRA9-myc-Fusionsproteine, hauptsächlich innerhalb der Parasitophoren Vakuole nachweisbar. Da die Immunfluoreszenzanalyse lediglich eine grobe Lokalisation der Proteine innerhalb der PV zulässt, wurden die GRA9-myc-Mutanten einer Feinanalyse unterzogen. Mittels Fraktionierungsanalysen sollte geklärt werden, ob die GRA9-myc-Fusionsproteine trotz einer Deletion entweder der amphiphilen Alpha-Helix oder der hydrophoben Regionen in der Lage sind, stabile Wechselwirkungen mit Membranen innerhalb der Parasitophoren Vakuole einzugehen. Da möglicherweise auch Proline innerhalb von PEST-Domänen ähnliche Interaktionen vermitteln, wurde das Konstrukt GRA9- $\Delta$ PEST-myc ebenfalls untersucht.

Zur Fraktionierungsanalyse wurden infizierte Zellen über eine wiederholte Einfrier- und Auftaumethode aufgeschlossen, bei der die Wirtszellen mechanisch aufgebrochen werden. Noch im Zelllysats intakte Parasitophore Vakuolen wurden zusätzlich über eine 27-gauge Kanüle aufgeschlossen. Die Wildtyp-Toxoplasmen bzw. RH-GRA9-myc-, RH-GRA9 $\Delta$ AH-myc-, RH-GRA9 $\Delta$ HH1-myc-, RH-GRA9 $\Delta$ HH2-myc- und RH-GRA9 $\Delta$ PEST-myc-Tachyzoiten wurden, gemeinsam mit den Bruchstücken der Wirtszelle, bei 2.800 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, der unter anderem das Innere der Parasitophoren Vakuole enthält, wurde anschließend über Ultrazentrifugation bei 45.000 rpm in eine lösliche („high speed supernatant“, HSS) sowie eine Membran-assoziierte („high speed pellet“, HSP) Fraktion partitioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Verteilung des GRA9-myc-Proteins bzw. der deletierten GRA9-myc-Mutanten über Western-Blot mit anti-GRA9-Serum bzw. anti-myc-Antikörper analysiert.

Als Qualitätskontrolle der geschilderten Fraktionierungsmethode wurde die Lokalisation von GRA1 und GRA2 in den unterschiedlichen Fraktionen untersucht. Dabei war bekannt, dass GRA1 als lösliches Protein nur in der HSS-Fraktion zu detektieren ist, wohingegen das Netzwerk-assoziierte GRA2-Protein in der HSP- und der HSS-Fraktion präsent sein muss. Abbildung 4.11 A zeigt, dass in den analysierten Präparationen GRA1 ausschließlich in der „high speed supernatant“ (HSS)-Fraktion nachgewiesen werden konnte. Die Existenz von GRA2 wurde dagegen, wie bereits publiziert, in beiden Fraktionen detektiert. Abbildung 4.11 B zeigt das Ergebnis der subzellulären Verteilung von GRA9 in RH-Wildtyp-Tachyzoiten und in den RH-GRA9-myc-Fusionsmutanten innerhalb der Parasitophoren Vakuole. In allen

Fractionen erfolgte die Detektion von GRA9 dominant im „high speed supernatant“ (HSS), sowie zu geringeren Teilen in der „high speed pellet“-Fraktion (HSP). Dies bedeutet, dass GRA9 in RH-Tachyzoiten und auch in allen RH-GRA9-Fusionsmutanten überwiegend als lösliches aber zum geringeren Teil auch als Membran-gebundenes Protein innerhalb der Parasitophoren Vakuole vorliegt.



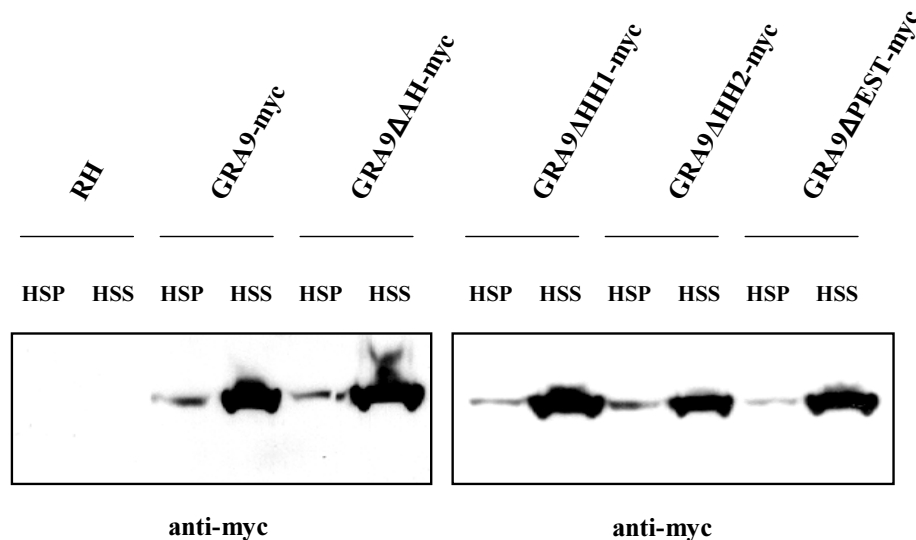
**Abb. 4.11: Verteilung von GRA9 in RH-GRA9-myc-Mutanten innerhalb der PV**

(A) Subzelluläre Verteilung von GRA1 und GRA2 in RH-Tachyzoiten. Der Nachweis erfolgte mittels spezifischer anti-GRA1- und anti-GRA2-Antikörper sowie Peroxidase-gekoppelter anti-Maus-Sekundärantikörper. (B) *T. gondii*-Lysat intrazellulärer RH-Toxoplasmen, RH-GRA9-myc-Tachyzoiten sowie RH-GRA9-myc-Deletionsmutanten wurde über Ultrazentrifugation in eine „high speed supernatant“ Fraktion (HSS) sowie eine „high speed pellet“ Fraktion (HSP) partitioniert und die isolierten Fraktionen im Western-Blot mit anti-GRA9-Serum sowie Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern analysiert.

Die Existenz des endogenen Proteins in allen RH-Mutanten machte den Nachweis mit spezifischen anti-myc-Antikörpern erforderlich, um analysieren zu können, ob sich das Protein-Verteilungsmuster ändert, sofern die putativen Membran-Interaktionsdomänen nicht mehr für eine Membran-Assoziation zur Verfügung stehen. Die Fraktionierungsanalyse der RH-GRA9-myc-Deletionsmutanten mit spezifischen anti-myc-Antikörpern (Abbildung 4.12) zeigt, dass die Fusionsproteine GRA9ΔAH-myc-, GRA9ΔHH1-myc-, GRA9ΔHH2-myc- und GRA9ΔPEST-myc ebenso wie endogenes GRA9 hauptsächlich in der „high speed supernatant“ (HSS)-Fraktion, sowie in geringeren Mengen in der „high speed pellet“-Fraktion (HSP) lokalisiert sind. Als Kontrolle erfolgte die Detektion des undeletierten GRA9-myc-Fusionsproteins. GRA9-myc ist sowohl als aggregiertes, als auch als lösliches Protein in der



Parasitophoren Vakuole nachweisbar (Abbildung 4.12) und zeigt keine Veränderung im Protein-Verteilungsmuster im Vergleich zu RH-Wildtyp-Tachyzoiten, detektiert mit anti-GRA9-Antikörpern (Abbildung 4.11 B). Aufgrund dieses Befundes kann eine Beeinträchtigung des Lokalisationsverhaltens von GRA9 durch das angefügte myc-Epitop ausgeschlossen werden.



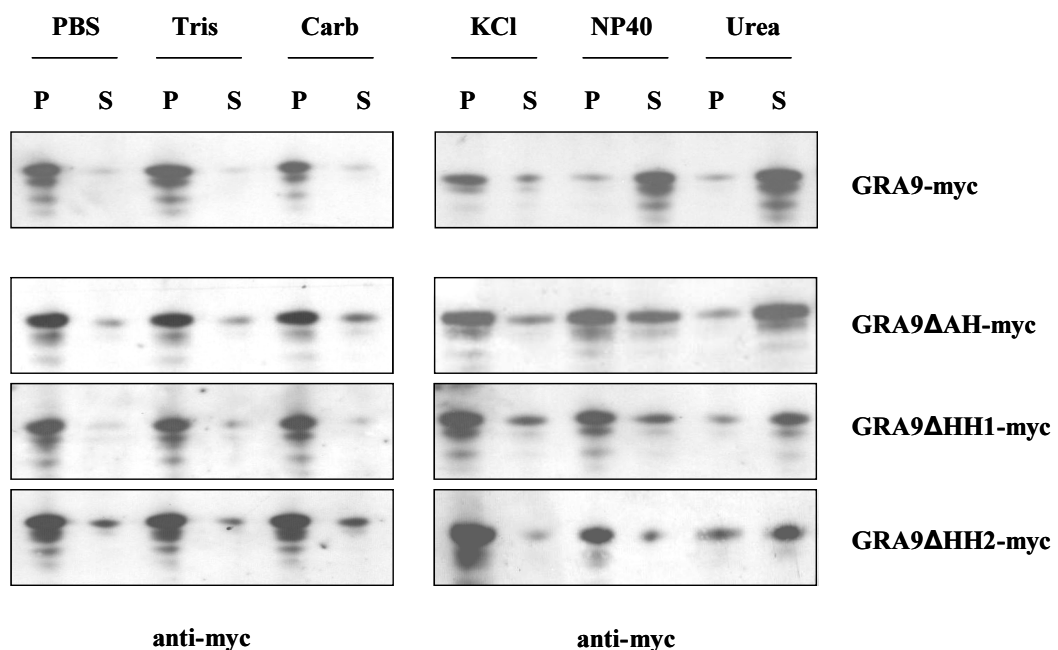
**Abb. 4.12: Lokalisationsnachweis der myc-Fusionsproteine innerhalb der PV**

Das Lysat von HFF-Zellen, die mit RH-Tachyzoiten bzw. mit RH-GRA9-myc-, RH-GRA9ΔAH-myc-, RH-GRA9ΔHH1-myc-, RH-GRA9ΔHH2-myc- und RH-GRA9ΔPEST-myc-Tachyzoiten infiziert wurden, wurde über Ultrazentrifugation partitioniert und im Western-Blot mit anti-myc-Antikörpern und entsprechenden Peroxidasegekoppelten anti-Maus-Sekundärantikörpern detektiert.

Der Nachweis von RH-GRA9ΔAH-myc-, RH-GRA9ΔHH1-myc-, RH-GRA9ΔHH2-myc- und RH-GRA9ΔPEST-myc sowie GRA9-myc als freies und als Membran-assoziiertes Protein innerhalb der PV zeigt, dass GRA9 an membranöse Strukturen innerhalb der PV binden kann, auch wenn die amphiphile Alpha-Helix und die hydrophoben Regionen oder die PEST-Domäne deletiert wurden. Es existieren jedoch geringe quantitative Unterschiede. So sind die Fusionsproteine GRA9ΔHH1-myc, GRA9ΔHH2-myc und GRA9ΔPEST-myc im Vergleich zum undeletierten GRA9-myc-Konstrukt geringfügig schwächer in der HSP-Fraktion (Abbildung 4.12) nachzuweisen.

#### 4.6. Detaillierte Analyse der GRA9-Assoziation an membranöse Strukturen innerhalb der Parasitophoren Vakuole

Die durchgeführten Fraktionierungsanalysen belegen, dass alle GRA9-myc-Fusionsproteine in der Lage sind, mit Membranen zu interagieren. In einem weiteren Ansatz sollte die Stärke der Membran-Interaktion näher analysiert werden. Dazu wurden die unterschiedlichen HSP-Fractionen mit verschiedenen denaturierenden Agenzien weiter behandelt. Als destabilisierende Chemikalien wurden 0.1 M Natrium-Carbonat, 0,5 M KCl, 1 % NP40 und 6 M Harnstoff verwendet. Als Kontrolle wurden die Proben in PBS bzw. Tris-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation mit diesen verschiedenen Agenzien wurden die HSP-Fractionen einer erneuten Ultrazentrifugation unterzogen und das resultierende Pellet (P: stark Membran-gebundene Bestandteile) sowie der Überstand (S: abgelöste Proteine) im Western-Blot mit spezifischen anti-myc-Antikörpern analysiert. Das Ergebnis der detaillierten Feinfraktionierung ist in Abbildung 4.13 dargestellt.



**Abb. 4.13: Stabile GRA9-Membran-Assoziation erfolgt unabhängig von der amphiphilen Alpha-Helix sowie den hydrophoben Sequenzdomänen von GRA9**

Lysate der Parasitophoren Vakuolen, von den unterschiedlichen GRA9-myc-Mutanten gebildet, wurden wie beschrieben in eine HSS- und HSP-Fraktion aufgetrennt. Die HSP-Fraktion wurde in verschiedene Detergenzien (PBS, Tris, Carb=Natriumcarbonat, KCl, NP40, Urea) aufgenommen und erneut über Ultrazentrifugation in eine HSS- und HSP-Fraktion getrennt. Die resultierenden Fraktionen wurden im Immunoblot auf die Existenz der GRA9-myc-Fusionsproteine analysiert.

Die in der Parasitophoren Vakuole gebundenen, verschiedenen GRA9-myc-Fusionsproteine lassen sich, im Vergleich zur PBS- und Tris-Puffer-Kontrolle, geringfügig durch die denaturierenden Agenzien wie Carbonat und Kalziumchlorid solubilisieren. Eine stärkere Auflösung der GRA9-myc-Membran-Assoziation erfolgte in allen Proben durch das chaotrope Agens Harnstoff sowie durch das nicht-ionische Detergenz NP-40. Wie das GRA9-myc-Protein lassen sich die Proteine aller GRA9-Deletionsmutanten nur mit Harnstoff und NP40 in nennenswertem Umfang aus dem HSP lösen. Somit ergibt sich qualitativ kein Unterschied in der Membranbindungskapazität der verschiedenen GRA9-myc-Mutanten. Die geringfügigen quantitativen Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben sind aufgrund der mannigfaltigen Konzentrations- und Aufreinigungsschritte zur Generierung der Proben nicht eindeutig interpretierbar.

#### **4.7. Ansätze zur Identifizierung molekularer GRA9-Interaktionspartner**

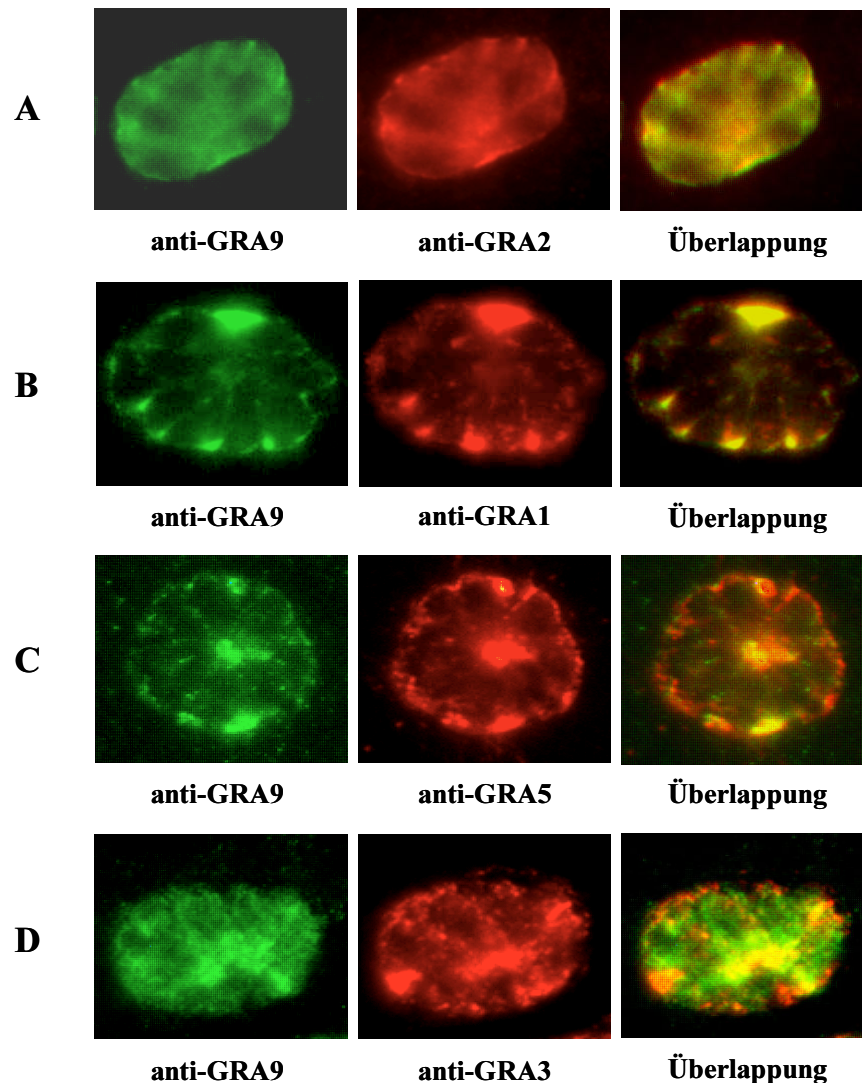
Die bisherigen Untersuchungen dienten der Analyse der Interaktion von GRA9 mit membranösen Strukturen innerhalb der Parasitophoren Vakuole. GRA-Proteine können jedoch nicht nur mit Membranen assoziieren, sondern auch miteinander reagieren und Komplexe ausbilden. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob GRA9 mit anderen GRA-Proteinen interagiert, die eine ähnliche Lokalisation zeigen.

##### **4.7.1. Analyse von GRA9 Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der Parasitophoren Vakuole**

Molekulare Interaktionspartner können wichtige Hinweise für eine Funktion der GRA-Proteine liefern. Auf der Suche nach GRA9-Interaktionspartnern ist davon auszugehen, dass besonders Proteine, die in der Parasitophoren Vakuole an identischen Stellen nachgewiesen werden, potentielle Interaktionspartner von GRA9 sind. Erste Hinweise bezüglich dieser These konnten durch IFA-Analysen erbracht werden.

Im Folgenden wurde eine Doppel-Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. HFF-Zellen wurden für 24 Stunden mit RH-Tachyzoiten inkubiert und anschließend mit 3 %-iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Um die Wirtszellmembran sowie die Membran der Parasitophoren Vakuole für Antikörper durchlässig zu machen, erfolgte eine Permeabilisierung

mit 0,2 % Triton-X-100. In Abbildung 4.14 sind unter anderem die Ergebnisse einer GRA9-GRA2-Doppel-Immunfluoreszenz dargestellt.



**Abb. 4.14: Co-Lokalisation von GRA9 mit *Toxoplasma gondii* GRA-Proteinen innerhalb der PV**

Mit RH-Tachyzoiten infizierte HFF-Zellen wurden mit 3 % Paraformaldehyd fixiert und mit 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert. Die Detektion der GRA-Proteine erfolgte mit anti-GRA9-Serum, bzw. mit spezifischen anti-GRA1-, anti-GRA2-, anti-GRA3- sowie anti-GRA5-Antikörpern. GRA9-Antikörper wurden schließlich durch Verwendung von  $\text{cy}^2$ -markierten anti-Kaninchen Antikörpern (grün) detektiert. Der Nachweis von GRA1, GRA2, GRA3 und GRA5 erfolgte mittels  $\text{cy}^3$ -markierter anti-Maus-Immunglobuline (rot).

Die Überlagerung der Fluoreszenzanalysen weist eine absolute Co-Lokalisation der beiden Proteine innerhalb der Parasitophoren Vakuole von *T. gondii* auf (Abbildung 4.14 A). Die Überlagerung des grün-fluoreszierenden GRA9-Proteins und des rot gefärbten GRA2-Proteins zeigt eine vollständige Co-Lokalisation in der Parasitophoren Vakuole.

Eine vergleichbare Co-Lokalisation wurde für GRA9 und GRA1 nachgewiesen. Vereinzelt ist diese Co-Lokalisation lediglich durch einige wenige, partielle Spots entsprechend des GRA1-Proteins in den Zwischenräumen der Tachyzoiten unterbrochen, erkennbar an den verbleibenden roten Spots bei der Überlagerung beider Fluoreszenzbilder (Abbildung 4.14 B). Die Doppel-Immunfluoreszenzanalyse von GRA9 mit den Proteinen GRA5 und GRA3 zeigt dagegen nur eine partielle Co-Lokalisierung der Proteine auf. GRA5 ist bekannt als ein hauptsächlich an der Membran der Parasitophoren Vakuole (PVM) lokalisiertes Protein. Diese Assoziation ist auch in der Abbildung 4.14 C erkennbar. Die Doppel-Immunfluoreszenz mit GRA9 zeigt eine Co-Lokalisation von GRA9 und GRA5 in einigen Bereichen der PVM. Die Analyse von GRA3 zeigt die Lokalisation dieses Proteins insbesondere im Lumen der Parasitophoren Vakuole sowie an der Innenseite der PVM (Abbildung 4.14 D), wodurch eine örtlich beschränkte Co-Lokalisation von GRA9 mit GRA3 in diesen Bereichen resultiert.

#### **4.7.2. Analyse von GRA9-Protein-Protein-Interaktionen durch Immunpräzipitation**

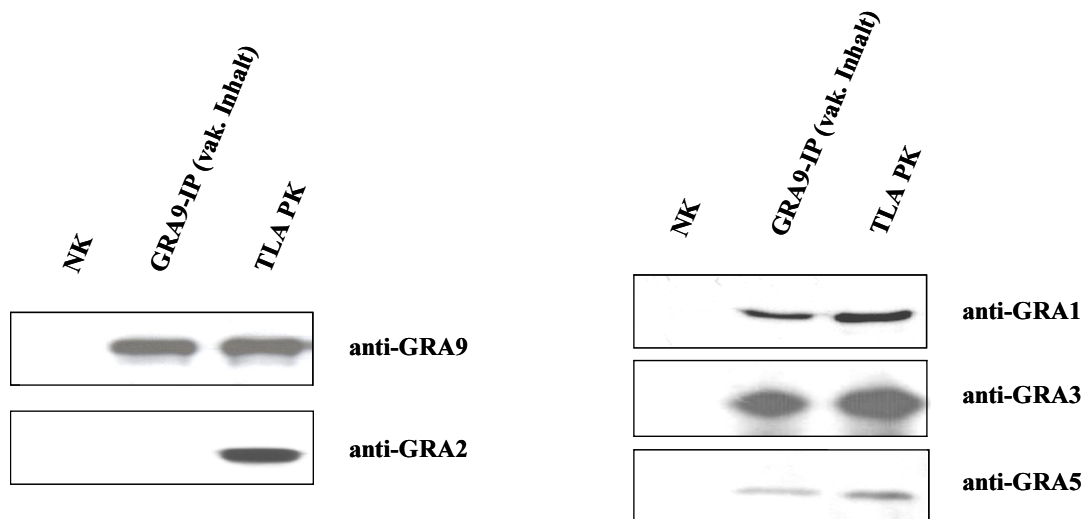
Die geschilderten Doppel-Immunfluoreszenzanalysen erlauben die Annahme, dass GRA9 innerhalb der Parasitophoren Vakuole mit anderen GRA-Proteinen interagiert. Um eine mögliche Interaktion von GRA9 mit anderen GRA-Proteinen nachzuweisen, wurden Co-Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt.

Um zu testen, ob GRA9 innerhalb der Parasitophoren Vakuole Interaktionen mit anderen GRA-Proteinen eingeht, wurden Lysate von Toxoplasmen-infizierten Wirtszellen hergestellt. Durch eine Präinkubation der Lysate mit Protein-G-Sepharose wurden unspezifisch an die Matrix bindende Proteine aus dem Ansatz entfernt. Nach einer Inkubation des Lysats mit anti-GRA9-Antikörpern wurde GRA9, zusammen mit seinen potentiellen Interaktionspartnern, über eine erneute Passage mit Hilfe einer Protein-G-Sepharose-Bindematrix isoliert. Die gebundenen Antikörper-Protein-Komplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und einem immunchemischen Nachweis im Western-Blot unterzogen.

Abbildung 4.15 zeigt das Ergebnis der GRA9-Immunpräzipitation nach der Analyse mit Antikörpern gegen GRA9, GRA1, GRA2, GRA3 und GRA5. Als Positivkontrolle zur Detektion der GRA-Proteine diente isoliertes *T. gondii*-Lysat von RH-Tachyzoiten. Als Negativkontrolle wurde ein über Protein-G-Sepharose gereinigtes Lysat verwendet, dem keine spezifischen Antikörper zugesetzt wurden.

Wie in der Abbildung 4.15 dargestellt, ist GRA9 wie erwartet in der TLA-Positivkontrolle sowie in dem Immunpräzipitat von GRA9 deutlich zu detektieren.

Die Immunoblotanalyse mit anti-GRA2-Antikörpern zeigt dagegen, dass GRA2 nur in der TLA-Positivkontrolle, nicht jedoch im GRA9-Immunpräzipitat vorhanden ist. Da GRA2 nicht mit GRA9 co-präzipitiert wird, kann eine direkte Interaktion der beiden Proteine ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu werden die Proteine GRA1, GRA3 und GRA5 in den Lysaten von Toxoplasmen-infizierten Wirtszellen (Lumen der PV) durch GRA9 co-präzipitiert. Die nicht zu detektierenden Protein-Signale in der Negativkontrolle sowie der deutliche Nachweis der spezifischen Proteinbanden für GRA1, GRA3 und GRA5 in der TLA-Positivkontrolle belegen die Spezifität dieser angewendeten Detektionsmethode.

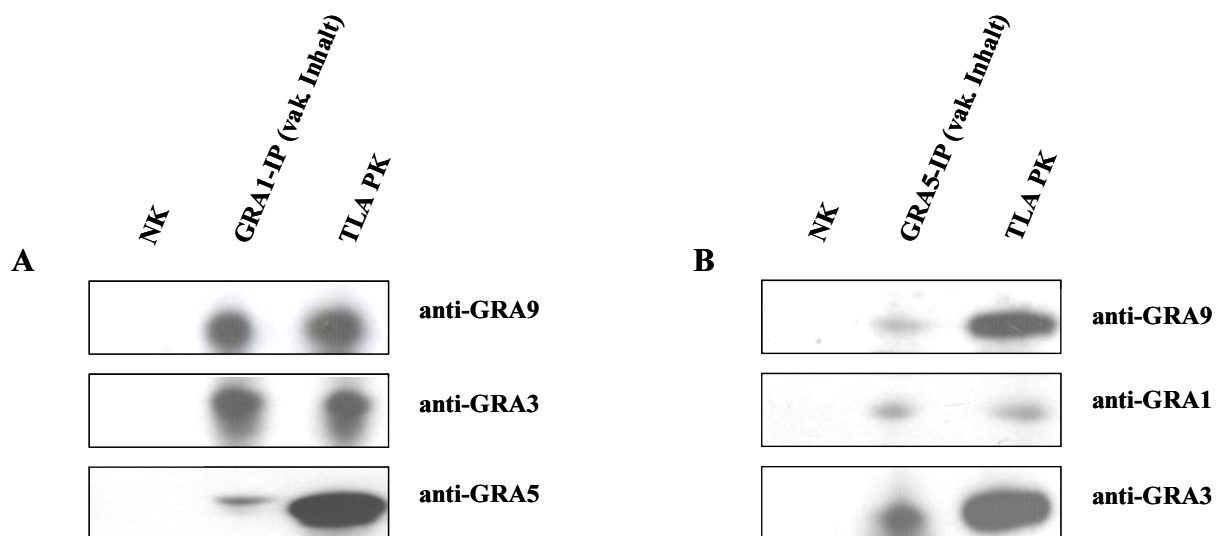


**Abb. 4.15: Interaktion von GRA9 mit dem löslichen Protein GRA1 sowie den PVM-assoziierten Proteinen GRA3 und GRA5**

Für die GRA9-Immunpräzipitation (Co-IP) wurden Lysate der Parasitophoren Vakuole (vak. Inhalt, Zellen für 36 Stunden mit  $4 \times 10^8$  Tachyzoiten infiziert) isoliert, mit Protein-G-Sepharose vorinkubiert, und die resultierenden Überstände nach Zentrifugation mit anti-GRA9 Antiserum versetzt. Gebildete Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend an Protein-G-Sepharose gereinigt. Über SDS-PAGE wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe aufgetrennt und im Western-Blot mit anti-GRA9-Serum sowie anti-GRA1-, anti-GRA2-, anti-GRA3- und anti-GRA5-Antikörpern analysiert. Als Positivkontrolle wurde RH *T. gondii*-Lysat (TLA PK) mit auftragen, als Negativkontrolle (NK) wurde die Protein-G-Sepharose im Überstand ohne Antikörper inkubiert.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass GRA9 eine Interaktion mit den Proteinen GRA1, GRA3 und GRA5 innerhalb der Parasitophoren Vakuole eingeht. Um diesen Befund zu überprüfen, sollte weiterführend analysiert werden, ob GRA9 ebenfalls in GRA1- und GRA5-Immunpräzipitaten nachgewiesen werden kann (aufgrund zu geringer Mengen vorhandener anti-GRA2- und anti-GRA3-Antikörper konnten entsprechende Immun-

präzipitationsanalysen nicht durchgeführt werden). Wie in Abbildung 4.16 dargestellt, erfolgt eine deutliche Detektion von GRA9 im GRA1-Immunpräzipitat der Parasitophoren Vakuole (vak. Inhalt) (Abbildung 4.16 A). In der Negativkontrolle (Lysat ohne spezifische Antikörper) konnte dagegen kein GRA9-Signal nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der Analyse des GRA5-Immunpräzipitats erhalten. Der Nachweis eines spezifischen GRA9-Signals im Lysat der Parasitophoren Vakuole zeigt, dass GRA9 mit GRA5 co-präzipitiert wird (Abbildung 4.16 B). Damit ist eine Interaktion der Proteine GRA9-GRA1 und GRA9-GRA5 bestätigt.



**Abb. 4.16: Bestehende Interaktion zwischen den GRA-Proteinen GRA1, GRA3, GRA5 und GRA9**

GRA1- (A) und GRA5- (B) Immunpräzipitationsanalyse mit *T. gondii*-Lysaten (HFF-Zellen für 36 Stunden mit  $4 \times 10^8$  Tachyzoiten infiziert) intrazellulärer Parasiten (vak. Inhalt). Spezifisch gebildete GRA1- bzw. GRA5-Komplexe wurden mit Protein-G-Sepharose aus dem *T. gondii*-Lysat entfernt und nach SDS-PAGE im Western-Blot mit anti-GRA9-Serum sowie anti-GRA1, anti-GRA3- und anti-GRA5-Antikörpern detektiert. Als Positivkontrolle diente RH *T. gondii*-Lysat (TLA), die Negativkontrolle (NK) enthält den isolierten Protein-G-Sepharose-Überstand ohne Antikörperinkubation.

Zusätzlich zeigt Abbildung 4.16, dass die GRA9-Interaktionspartner GRA1, GRA3 und GRA5 auch untereinander interagieren. So lassen sich neben GRA9 die Proteine GRA3 und GRA5 im GRA1-Immunpräzipitat nachweisen (Abbildung 4.16 A).

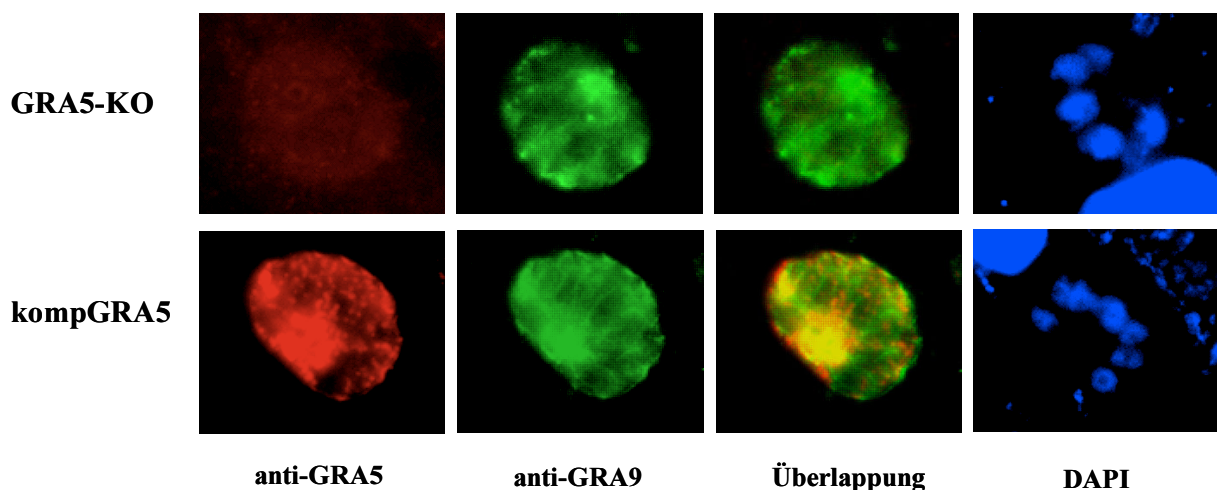
Ferner zeigt die Co-Immunpräzipitationsanalyse, dass die Proteine GRA1 und GRA3 ebenfalls mit GRA5 co-präzipitiert werden (Abbildung 26 B). Diese erzielten Ergebnisse belegen, dass die GRA9-Interaktionspartner GRA1, GRA5 und GRA3 ein Proteingerüst ausbilden können und untereinander sowie miteinander interagieren.

#### 4.8. Subzelluläre Lokalisation von GRA9 und GRA1 in einer GRA5-knock-out-Mutante

Entsprechend der Befunde, basierend auf der Co-Immunpräzipitation, interagiert das hauptsächlich Membran-gebundene Protein GRA5 mit den GRA-Proteinen GRA1, GRA3 und GRA9. Es ist daher möglich, dass GRA5 für den Transport von GRA1, GRA3 und GRA9 in die Parasitophore Vakuole oder an dem Aufbau und Erhalt eines Proteingerüsts beteiligt ist.

Zur Analyse eines möglichen Einflusses von GRA5 auf das korrekte „Targeting“ anderer GRA-Proteine wurde eine *Δgra5*-Mutante (GRA5-KO) sowie eine komplementierte *Δgra5*-Mutante (kompGRA5) für weitere Immunfluoreszenzanalysen verwendet. Die Konstruktion von GRA5-KO sowie der komplementierten GRA5-Mutante erfolgte durch Frau Dr. Corinne Mercier (Universität Joseph Fourier in Grenoble, Mercier *et al.*, 2001).

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von GRA1 und GRA9 innerhalb der Parasitophoren Vakuole wurden HFF-Zellen mit den GRA5-Mutanten für 24 Stunden infiziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung erfolgte der Protein-Nachweis mit spezifischen GRA1- und GRA5- bzw. GRA9-Antikörpern. Zusätzlich wurde die DNA mit DAPI angefärbt. Das Ergebnis dieses Experiments ist in den Abbildungen 4.17 und 4.18 dargestellt.

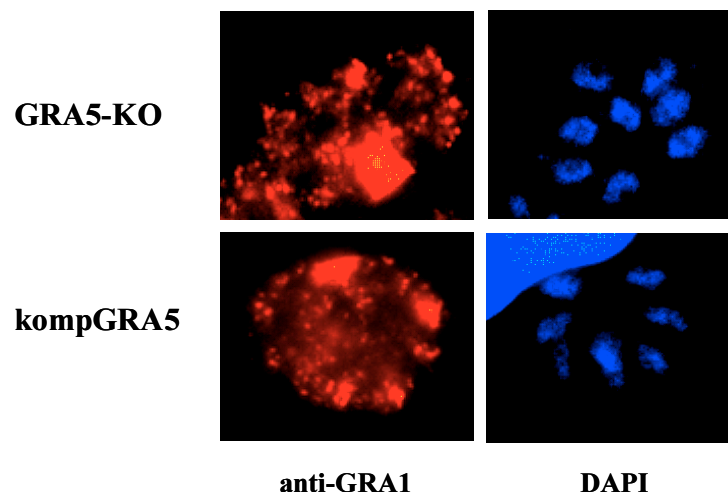


**Abb. 4.17: Immunfluoreszenzanalyse von GRA9 in GRA5-„knock-out“-Mutanten**

Tachyzoiten-infizierte HFF-Zellen wurden für 24 Stunden kultiviert, mit 3 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend permeabilisiert. Es folgte eine Inkubation mit anti-GRA5- und anti-GRA9-Antikörpern. Die Detektion erfolgte mit cy<sup>3</sup>- (rot) bzw. cy<sup>2</sup>-(grün) markierten Sekundärantikörpern.



Das in Abbildung 4.17 gezeigte Experiment belegt, dass die von Frau Dr. Mercier erhaltene GRA5-knock-out-Mutante tatsächlich GRA5 nicht mehr exprimiert, während GRA5 in der komplementierten GRA5-Mutante deutlich nachweisbar ist. Die parallel durchgeführte Immunfärbung mit anti-GRA9-Antikörpern ergab eine deutliche Detektion von GRA9 in beiden Mutanten. Sowohl in der GRA5-Knock-out-Mutante, als auch in der komplementierten GRA5-Mutante, ist GRA9 innerhalb der Parasitophoren Vakuole, sowie geringfügig im Zytosol der Parasiten nachweisbar. Im Vergleich mit der komplementierten GRA5-Mutante, konnte somit keine Veränderung der GRA9-Lokalisation in der GRA5-defizienten Mutante festgestellt werden (Abbildung 4.17). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass das „Targeting“, sowie die Membran-Assoziation von GRA9 unabhängig vom Interaktionspartner GRA5 erfolgen. Des Weiteren wurde die Lokalisation von GRA1 in den GRA5-defizienten Parasiten und in den komplementierten GRA5-Mutanten durch Verwendung des anti-GRA1-Antikörpers analysiert (Abbildung 4.18). Wie in der folgenden Abbildung dargestellt, erfolgte die Detektion von GRA1 in beiden GRA5-Mutanten mit einem vergleichbaren Verteilungsmuster in der Parasitophoren Vakuole sowie granulär angereichert in den Parasiten. Auf Basis dieser Immunfluoreszenzanalyse kann somit eine essentielle Funktion von GRA5 auf das „Targeting“ von GRA1 weitestgehend ausgeschlossen werden.

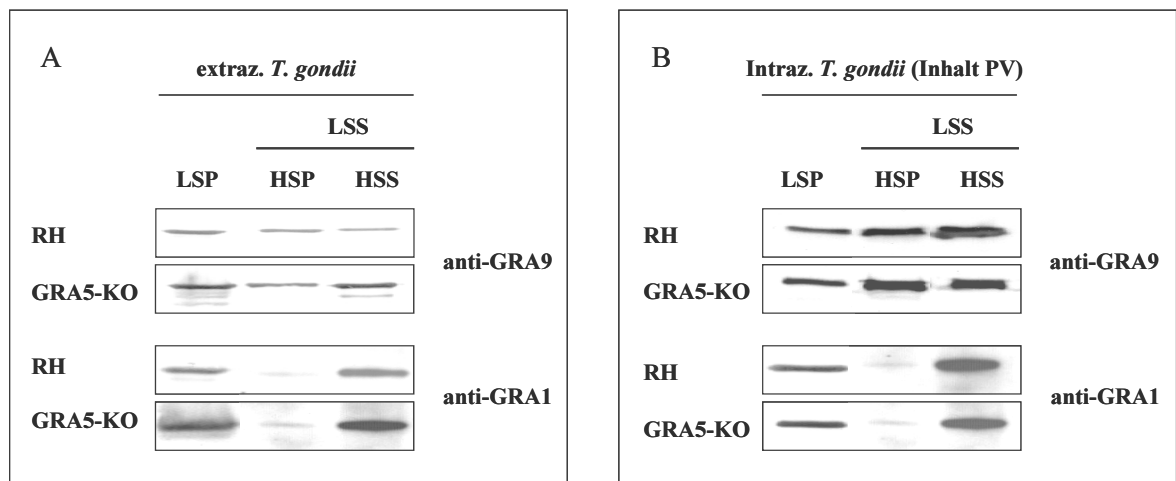


**Abb. 4.18: Fehlender Einfluss von GRA5 auf das „Targeting“ von GRA1**

GRA1-Immunfluoreszenzanalyse in GRA5-KO-Mutanten und in komplementierten GRA5-Parasiten. Die Tachyzoiten wurden für 24 Stunden auf HFF-Zellen angezogen, die Zellen mit 3 % Paraformaldehyd fixiert und mit 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert. Der Nachweis des GRA1-Proteins erfolgte mit spezifischen anti-GRA1-Antikörpern sowie durch Inkubation mit cy<sup>3</sup>-markierten Sekundärantikörpern.

#### 4.9. Detaillierte Analyse der GRA9- und GRA1-Lokalisation in einer GRA5-knock-out-Mutante durch Zellfraktionierung

Die mit den GRA5-Mutanten durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen konnten zeigen, dass GRA5 offensichtlich keinen Einfluss auf das „Targeting“ seiner Interaktionspartner GRA1 und GRA9 hat. Im Folgenden sollte in einer Feinanalyse geklärt werden, ob GRA5 an der Bindung von GRA1 und GRA9 an die Membranen der Parasitophoren Vakuole beteiligt ist. Dazu wurden sowohl Wildtyp-Toxoplasmen, als auch die GRA5-knock-out-Mutante verwendet. Wie bereits beschrieben (Kapitel 4.5.), wurden infizierte Zellen bzw. extrazelluläre Tachyzoiten aufgeschlossen und in eine Membranfraktion (high speed pellet: HSP) und in eine lösliche Fraktion (high speed supernatant: HSS) aufgetrennt. Die so gewonnenen Proben wurden im Immunoblot mit anti-GRA9- und anti-GRA1-Antikörpern analysiert. Wie in Abbildung 4.19 gezeigt, weisen die Proteine GRA9 und GRA1 eine unveränderte Verteilung in der HSP-Fraktion und in der HSS-Fraktion extrazellulärer (A) und intrazellulärer Parasiten (B) der GRA5-defizienten Tachyzoiten im Vergleich zum RH-Stamm auf. Die Detektion von GRA9 erfolgte in der HSP- und HSS-Fraktion der Wildtyp-Tachyzoiten sowie in der *Δgra5*-Mutante quantitativ gleich.



**Abb. 4.19: Unveränderte Membran-Assoziation von GRA9 und GRA1 in der GRA5-knock-out-Mutante**

Die Fraktionierungsanalyse zeigt die Verteilung von GRA9 und GRA1 in den Dichten-Granula (A) sowie in der Parasitophoren Vakuole (B) von RH-Wildtyp-Tachyzoiten im Vergleich zu GRA5-defizienten Tachyzoiten. Lysate extrazellulärer Tachyzoiten (TLA) und aus der Parasitophoren Vakuole (Inhalt PV) wurden bei 2.800 rpm abzentrifugiert, um Zellbruchstücke, Organellen und unaufgeschlossene Parasiten aus dem Lysat zu entfernen (LSP). Der resultierende Überstand (LSS) wurde durch Zentrifugation bei 45.000 rpm in eine lösliche „high speed supernatant“ Fraktion (HSS) sowie eine Membran-assoziierte „high speed pellet“ Fraktion (HSP) weiter partitioniert. Die Proben wurden im Immunoblot mit GRA1- und GRA9-spezifischen Antikörpern untersucht.

GRA1 wird im Gegensatz zu GRA9 in extrazellulären Parasiten sowie im PV-Lysat überwiegend in der löslichen HSS-Fraktion nachgewiesen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Vorbefunden, entsprechend derer es sich bei GRA1 um ein überwiegend lösliches Protein handelt. Die Analyse in den GRA5-defizienten Mutanten ergab für GRA1 und GRA9 keine Veränderung des Verteilungsmusters im Vergleich mit der Verteilung in RH-Wildtyp-Tachyzoiten.

Eine weitere Möglichkeit Zellen mechanisch aufzubrechen und die Proteine freizusetzen, ist die so genannte Sonifizierung. Dabei werden die Proben 3 x für jeweils 60 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Derart gewonnene Lysate wurden ebenfalls über Ultrazentrifugation in eine HSS- und eine HSP-Fraktion aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Auch mit dieser Methode ergab sich keine Verteilungsveränderung von GRA1 und GRA9 in Abwesenheit von GRA5 (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend belegen die Immunfluoreszenz-, die Co-Immunpräzipitations- und die Zellfraktionierungsanalyse, dass eine Interaktion zwischen den GRA-Proteinen GRA1, GRA5 und GRA9 existiert, der Interaktionspartner GRA5 jedoch keinen essentiellen Einfluss auf das „Targeting“ der analysierten GRA-Proteine ausübt sowie die Assoziation dieser Proteine an die membranösen Strukturen von *T. gondii* beeinflusst.

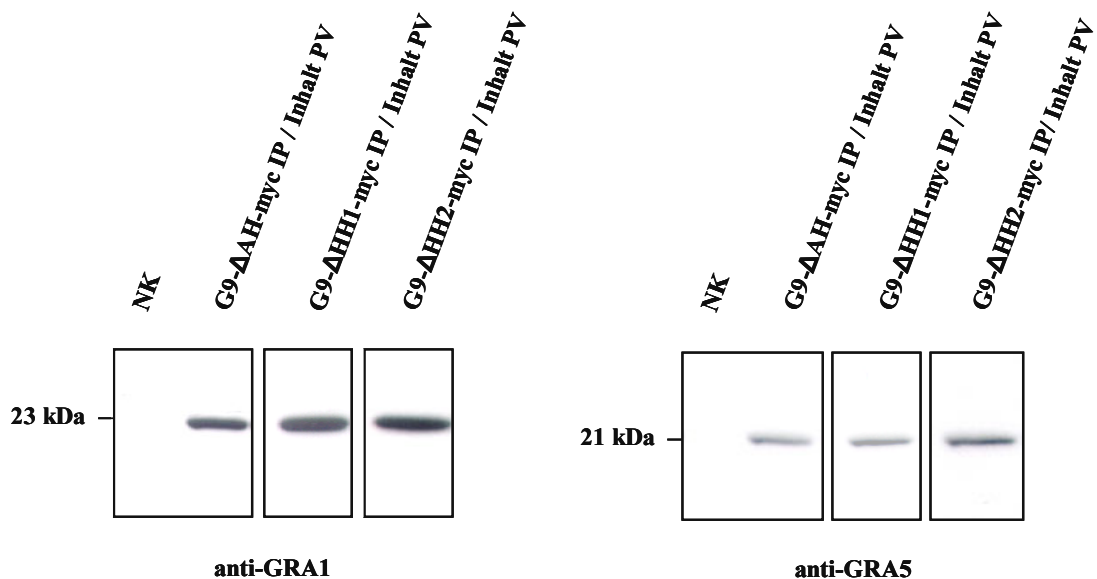
#### **4.10. Charakterisierung essentieller Domänen für die Protein-Protein-Interaktion des GRA9-Proteins**

Die bisherigen Befunde zeigen eindeutig, dass GRA9 sowohl mit Membranen als auch mit anderen GRA-Proteinen interagiert. Die für diese Interaktion essentiellen Molekülbereiche sind bisher jedoch unbekannt. Wie in Kapitel 4.1. geschildert, besitzt GRA9 insbesondere im C-terminalen Bereich hydrophobe Sequenzbereiche, die an diesen Assoziationen beteiligt sein könnten.

##### **4.10.1. Analyse des GRA1- und GRA5-Interaktionsverhalten mit GRA9-myc-Deletionsmutanten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, wie bereits geschildert, unterschiedliche GRA9-myc-Mutanten erzeugt (Kapitel 4.2.1.). Diese wurden im Folgenden für Co-Immunpräzipitationsanalysen verwendet. Die Abbildung 4.20 zeigt eindeutig, dass das GRA9-

Protein auch in der Abwesenheit der amphiphilen Helix oder der hydrophoben Regionen HH1 und HH2 mit den Proteinen GRA1 und GRA5 interagieren kann. Für die Co-Immunpräzipitationsanalyse wurden putative Komplexe mit den GRA9 $\Delta$ AH-, GRA9 $\Delta$ HH1- bzw. GRA9 $\Delta$ HH2-Deletionsproteinen, über das myc-Epitop aus *T. gondii*-Lysaten intrazellulärer Parasiten isoliert.



**Abb. 4.20: Interaktion der GRA9-myc-Deletionsproteine mit GRA1 und GRA5**

Nach Immunpräzipitation mit spezifischen anti-myc-Antikörpern wurden die erhaltenen Proben elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und einem Nachweis mit anti-GRA1- bzw. anti-GRA5-Antikörpern unterzogen. Eine Kreuzreaktion mit Protein-G-Sepharose kann durch eine ausbleibende Detektion in der Negativkontrolle (NK: Präzipitat ohne anti-myc-Antikörper) ausgeschlossen werden.

Wie in Abbildung 4.20 dargestellt, konnte das Protein GRA1 mit einer Größe von 23 kDa mit GRA9 $\Delta$ AH-myc, GRA9 $\Delta$ HH1-myc sowie GRA9 $\Delta$ HH2-myc erfolgreich co-präzipitiert werden. Ebenso wurde GRA5 in den GRA9 $\Delta$ AH-myc-, GRA9 $\Delta$ HH1-myc- und GRA9 $\Delta$ HH2-myc-Immunpräzipitaten auf einer Höhe von ca. 21 kDa gleichermaßen nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder die amphiphile Alpha-Helix noch die einzelnen hydrophoben Domänen alleine für die nachgewiesenen Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass diese verschiedenen Regionen funktionell redundant sind. Zudem ist denkbar, dass die im C-Terminus von GRA9 lokalisierten hydrophoben Domänen gemeinsam für das Assoziationsverhalten von GRA9 verantwortlich sind.

#### 4.11. *In vitro*-Interaktion von GRA1 und GRA5 mit Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Proteinen

Um die Bedeutung des C-terminalen Bereichs des GRA9-Proteins für das Bindungsverhalten von GRA9 zu analysieren, wurden mittels PCR C-terminale Verkürzungen von GRA9 hergestellt, unter Kontrolle des starken  $\beta$ -Tubulin-Promotors in das Expressionsplasmid pTub-myc eingefügt und in *T. gondii*-Tachyzoiten eingebracht.

##### 4.11.1. Generierung von Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Proteinen

In den vorangegangenen Untersuchungen (siehe Abb. 4.8 und 4.12) konnte gezeigt werden, dass das Hydrophilie-Verhalten von GRA9 durch Deletion der hydrophoben Domänen sowie der PEST-Domäne geringfügig verändert wird. Basierend auf diesen Vorbefunden wurden C-terminal verkürzte GRA9-Proteine hergestellt. Zur Konstruktion der ersten C-terminal verkürzten Mutante wurde der „reverse-Primer“ so gewählt, dass die *gra9*-Sequenz im 3' Bereich um 65 Aminosäuren verkürzt wurde. Diese Verkürzung geht einher mit einem Verlust der zweiten hydrophoben Domäne (HH2) sowie der PEST-Region und wird im Folgenden als GRA9 $\Delta$ 253-318 bezeichnet. Die Verkürzung der zweiten Mutante umfasst einen Sequenzbereich von 117 Aminosäuren und trägt die Bezeichnung GRA9 $\Delta$ 202-318. Diese verkürzte GRA9-Mutante zeichnet sich durch einen Verlust der beiden hydrophoben Regionen und die PEST-Domäne im C-Terminus aus. Die Abbildung 4.21 stellt die Konstruktion der C-terminal verkürzten GRA9-Mutanten schematisch dar.

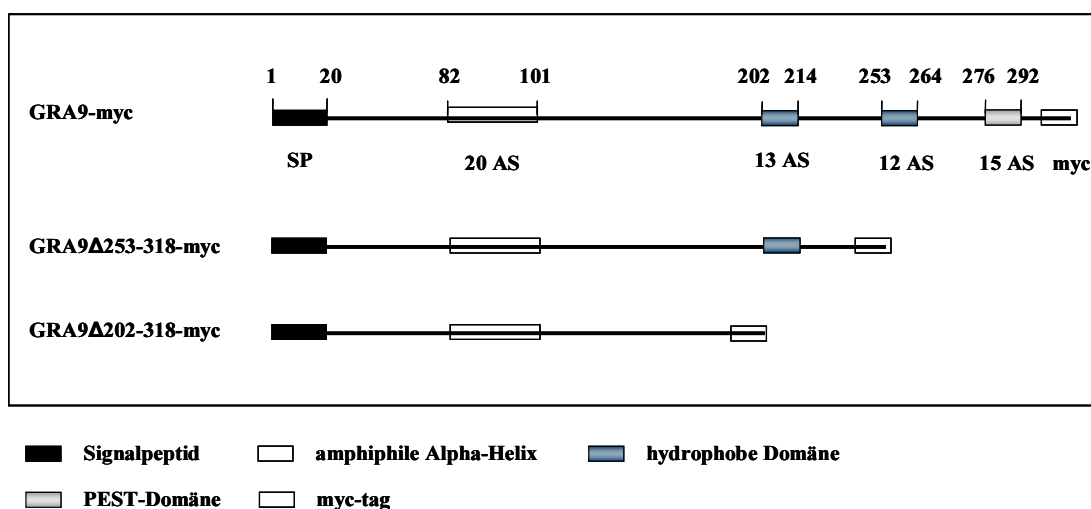
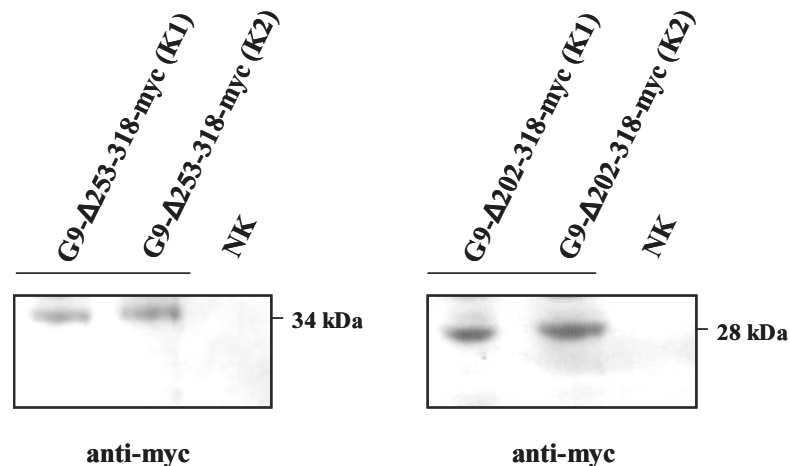


Abb. 4.21: Schematische Darstellung der Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Konstrukte GRA9 $\Delta$ 253-318-myc und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc

#### 4.11.2. Stabile Expression von Carboxy-terminal verkürzten GRA9-myc-Fusionsproteinen in RH-Tachyzoiten

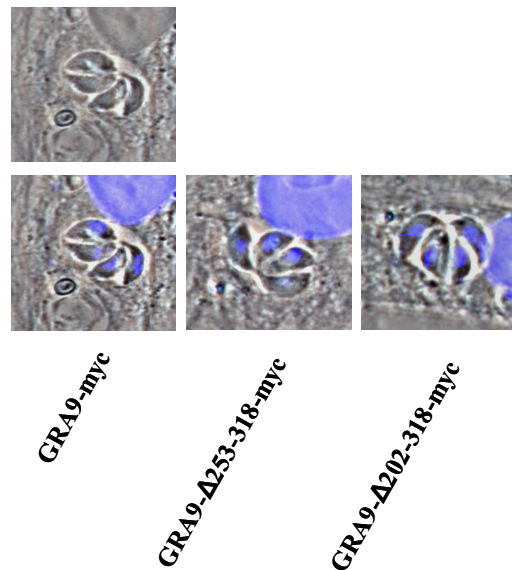
Die Expression von GRA9 $\Delta$ 253-318-myc und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc in RH-Tachyzoiten wurde im Immunoblot mit myc-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die C-terminal verkürzten Proteine RH-GRA9 $\Delta$ 253-318-myc und RH-GRA9 $\Delta$ 202-318-myc wurden entsprechend ihrer molekularen Masse auf einer Höhe von 34 kDa bzw. 28 kDa detektiert (jeweils 2 Klone pro Mutante getestet). Als Kontrolle wurde zusätzlich RH-Wildtyp *T. gondii*-Lysat mitgeführt. Erwartungsgemäß wurde das Wildtyp-GRA9-Protein nicht von den myc-Antikörpern erkannt (Abbildung 4.22).



**Abb. 4.22: Expression der Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Konstrukte in RH-Toxoplasmen**

Zum Expressionsnachweis von GRA9 $\Delta$ 253-318-myc und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc wurden entsprechende *T. gondii*-Lysate ( $1 \times 10^9$  Toxoplasmen/ml) im 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (zwei Klone pro Mutante, K1, K2), auf Nitrozellulose transferiert und immunologisch mit spezifischen anti-myc-Antikörpern (1:500) detektiert. Als Negativkontrolle (NK) wurde RH-Wildtyp-Lysat mitgeführt.

Des Weiteren wurden die RH-GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- und RH-GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Mutanten einer phänotypischen Analyse im Phasenkontrast unterzogen. Wie in Abbildung 4.23 dargestellt, haben sich 24 Stunden nach der Infektion Vakuolen mit je ca. vier Tachyzoiten in den Wirtszellen ausgebildet, die morphologisch nicht von denjenigen Vakuolen zu unterscheiden sind, die von Wildtyp-Toxoplasmen gebildet wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die verkürzten GRA9-Proteine die Vitalität der Toxoplasmen nicht beeinflussen.



**Abb. 4.23: Wachstum von GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Mutanten in HFF-Zellen**

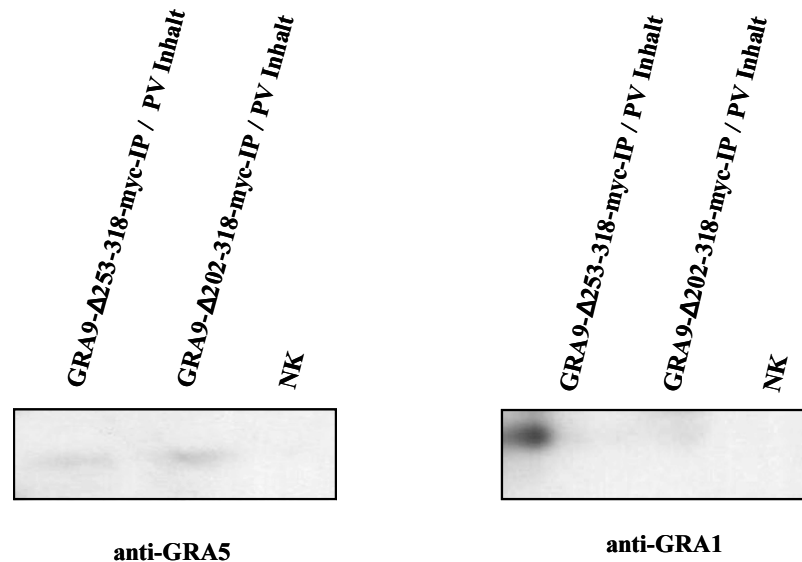
HFF-Wirtszellen wurden für 24 Stunden mit Wildtyp-Tachyzoiten bzw. mit GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- oder GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Mutanten infiziert. Nach Fixierung der Zellen mit 3 % Paraformaldehyd/PBS wurden die Zellen mit DAPI gefärbt, wodurch die DNA in den Zellkernen blau angefärbt wurde. Für GRA9-myc-Tachyzoiten ist der Phasenkontrast ohne DAPI-Färbung mit aufgeführt.

#### 4.11.3. Einfluss des Carboxy-terminalen Bereichs von GRA9 auf das Protein-Protein-Interaktionsverhalten innerhalb der Parasitophoren Vakuole

In den folgenden Analysen sollte untersucht werden, ob die gleichzeitige Deletion unterschiedlicher Domänen des GRA9-Proteins die Fähigkeit von GRA9 zur Interaktion mit anderen GRA-Proteinen beeinflusst. Der Inhalt der Parasitophoren Vakuole, der GRA9 $\Delta$ 253-318- bzw. GRA9 $\Delta$ 202-318-Tachyzoiten (PV-Inhalt), wurde mit Antikörpern gegen das myc-Epitop versetzt und die gebildeten Immunkomplexe über Protein-G-Sepharose isoliert. Das Immunpräzipitat wurde im Immunoblot auf die Anwesenheit von GRA1 und GRA5 analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24 dargestellt und zeigen, dass beide C-terminal verkürzten GRA9-myc-Proteine, im Vergleich zu GRA9-myc (Abbildung 4.15, Abbildung 4.20) eine reduzierte Bindungsfähigkeit mit GRA5 aufweisen.

Im Präzipitat der *T. gondii*-Stämme GRA9 $\Delta$ 253-318-myc bzw. GRA9 $\Delta$ 202-318-myc ist nach Inkubation mit anti-GRA5-Antikörpern nur eine schwache Bande auf der erwarteten Höhe von GRA5 detektierbar. Dieses schwache Signal des co-präzipitierten GRA5 in den Präzipitaten

von GRA9 $\Delta$ 253-318-myc und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc deutet darauf hin, dass der C-Terminus von GRA9 einflussreich an der Interaktion mit GRA5 beteiligt ist.



**Abb. 4.24: Co-Immunpräzipitation zur Analyse der Komplexbildung von GRA1 und GRA5 mit Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Proteinen**

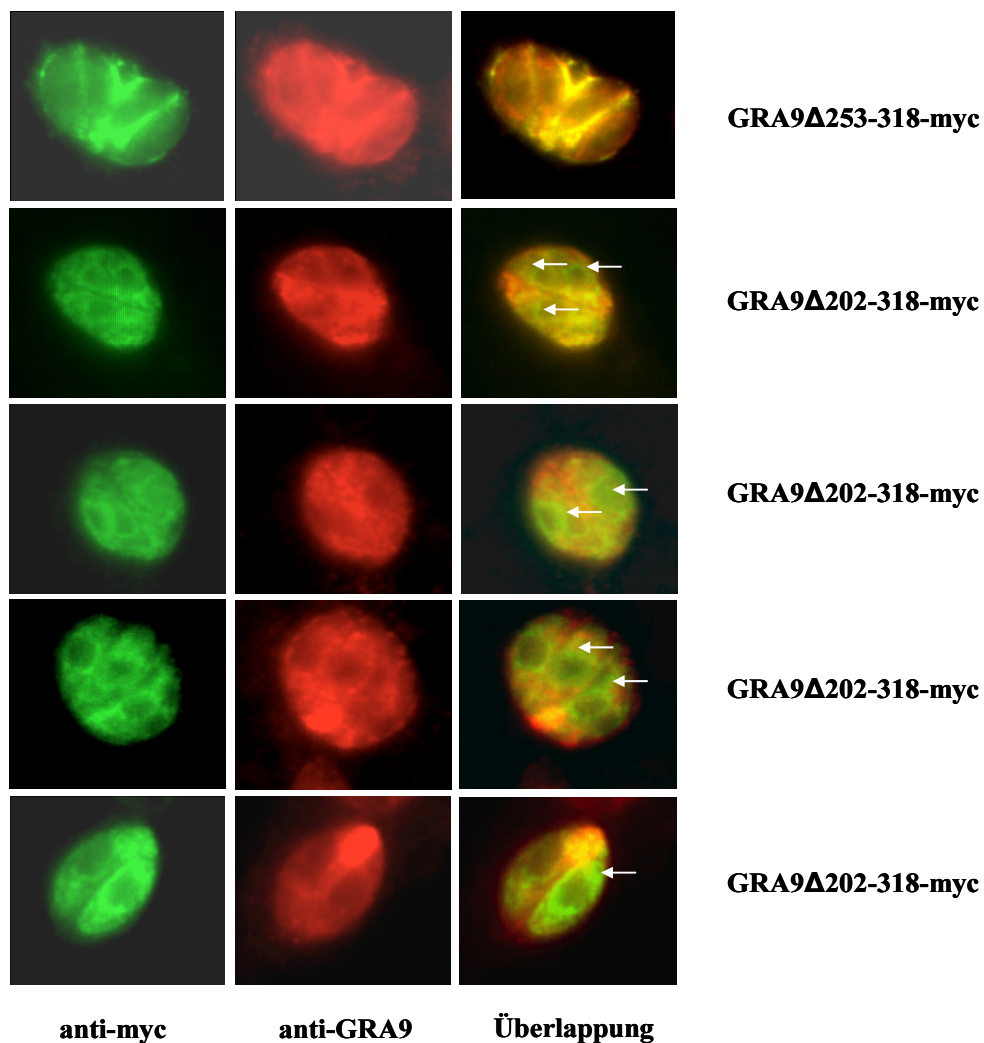
Für die Interaktionsanalyse wurde der Inhalt der Parasitophoren Vakuole, die von GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- bzw. GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Tachyzoiten gebildet wurde (PV-Inhalt, Zellen für 36 Stunden mit  $4 \times 10^8$  Tachyzoiten infiziert) über Nacht mit Antikörpern gegen das myc-Epitop inkubiert und die gebildeten Immunkomplexe über Protein-G-Sepharose isoliert. Die erhaltenen Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Antikörpern gegen GRA1 und GRA5 untersucht. Als Kontrolle wurde parallel unter Nutzung der gleichen Antikörper die Co-Immunpräzipitation mit den bereits genannten GRA9-Deletionsmutanten durchgeführt (siehe Abbildung 4.20) die alle eine deutliche Interaktion mit GRA1 und GRA5 eingehen.

Die verminderte Funktionsfähigkeit der C-terminal verkürzten GRA9-myc-Mutanten kann in der Analyse mit anti-GRA1-Antikörpern noch deutlicher nachgewiesen werden. Während die Mutante GRA9 $\Delta$ 253-318-myc die Fähigkeit zur Interaktion mit GRA1 fast unverändert besitzt (zum Vergleich GRA9-myc siehe Abbildung 4.15) fehlt diese Eigenschaft dem GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Protein nahezu vollständig. Diese Daten belegen, dass der C-terminale Bereich des GRA9-Proteins entscheidend zur Interaktion mit GRA1 und GRA5 beiträgt. Um zu überprüfen ob auch das „Targeting“ der C-terminal-verkürzten GRA9-Proteine in der Parasitophoren Vakuole verändert ist, erfolgte zusätzlich eine Immunfluoreszenzanalyse.



#### 4.11.4. Lokalisation der Carboxy-terminal verkürzten GRA9-Fusionsproteine GRA9 $\Delta$ 202-318-myc- und GRA9 $\Delta$ 253-318-myc in RH-Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii*

Um zu analysieren, ob der kombinierte Verlust verschiedener C-terminaler Domänen einen Einfluss auf das Verteilungsverhalten des GRA9-Proteins in der Parasitophoren Vakuole hat, wurden Doppel-Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Dabei wurden die verkürzten GRA9-Proteine mit anti-myc-Antikörpern, sowie das native GRA9 mit einem anti-GRA9-Antiserum angefärbt.



**Abb. 4.25: Verändertes Verteilungsmuster der GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Proteine in der PV**

Immunfluoreszenzanalyse von GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- und GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Proteinen (Mehrfachdarstellung) in der Parasitophoren Vakuole. Für den Nachweis wurden HFF-Zellen für 24 Stunden mit GRA9 $\Delta$ 253-318-myc- sowie GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Mutanten infiziert. Das native GRA9 wurde mit einem cy<sup>3</sup>-markierten Sekundärantikörper (rot) detektiert, während die trunkierten GRA9-Proteine mit einem cy<sup>2</sup>-markierten Antikörper (grün) nachgewiesen wurden. Die Retention der verkürzten GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Proteine in den Tachyzoiten ist durch weiße Pfeile markiert.

Wie in Abbildung 4.25 zu sehen, führt der Verlust der C-terminalen Aminosäuren von GRA9 zu Fehlern im „Targeting“ des Proteins in der Parasitophoren Vakuole. Diese Störung ist an der nur unvollständigen Co-Lokalisation des GRA9- und des myc-Fluoreszenzsignals ersichtlich.

Während das GRA9-Protein überwiegend homogen in der PV sowie im Zytosol der intrazellulären Parasiten lokalisiert vorliegt, ist das Fluoreszenzsignal des GRA9 $\Delta$ 253-318-myc-Proteins nicht mehr gleichermaßen in der PV, und in den Tachyzoiten verteilt, sondern wird deutlich konzentriert entlang der Plasmamembran der einzelnen Tachyzoiten detektiert.

Die Doppel-Immunfluoreszenzanalyse von GRA9 $\Delta$ 253-318-myc ergab zudem keinen Überlappungsbereich mit dem nativen GRA9-Protein innerhalb des Zytosols. Die deutliche Rotfluoreszenz innerhalb der Tachyzoiten belegt eine Reduktion des myc-markierten GRA9 $\Delta$ 253-318-myc-Proteins innerhalb des Parasiten.

Das Verteilungsmuster des GRA9 $\Delta$ 253-318-myc-Fusionsproteins lässt darauf schließen, dass das Protein weiterhin erfolgreich in die PV sekretiert wird. Aufgrund der lokalen Ansammlung entlang der Tachyzoiten-Membran erfolgt jedoch möglicherweise nur eine eingeschränkte Interaktion mit der Netzwerkstruktur innerhalb der PV.

Die Doppel-Immunfluoreszenzanalyse des myc-getaggten GRA9 $\Delta$ 202-318-myc-Proteins, im Vergleich zum nativen GRA9, zeigt eine noch deutlichere Verschiebung des Verteilungsmusters des verkürzten Proteins. Das um 117 Aminosäuren verkürzte GRA9-Protein zeigt eine ringförmige Anreicherung innerhalb der Tachyzoiten (Abbildung 4.25 zeigt das Ergebnis aus mehreren Experimenten). Auch in der Parasitophoren Vakuole weist das trunkierte Protein eine Änderung des Verteilungsmusters auf, was an der nur partiellen Co-Lokalisation mit dem nativen GRA9 in diesem Bereich erkennbar ist.

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass der C-terminale Bereich von GRA9 wesentlich an der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist und auch das „Targeting“ des GRA9-Proteins innerhalb der Parasitophoren Vakuole nachhaltig beeinflusst.

## 5. Diskussion

Vor 10 Jahren wurde von unserer Arbeitsgruppe ein neues, immundominantes Antigen von *Toxoplasma gondii* beschrieben (Nockemann *et al.*, 1998). Nach erfolgreicher Lokalisation dieses Proteins in den Dichten-Granula (DGs) konnten wir dieses primär als B10 bezeichnete Protein endgültig als GRA9 definieren (Adjogble *et al.*, 2004).

Als obligat intrazellulärer Parasit ist *Toxoplasma gondii* in der Lage, jede kernhaltige Zelle warmblütiger Tiere sowie des Menschen zu infizieren und sich darin zu replizieren (Dubay, 1994; Luft und Remington, 1992). Die Invasion von *T. gondii*-Tachyzoiten in die Wirtszelle und die intrazelluläre Entwicklung des Parasiten werden durch sekretorische Organellen reguliert, die ihre Proteine (MIC1-10, ROP1-8/18 und GRA1-9) gezielt nacheinander freisetzen (Dubey *et al.*, 1998, Dubremetz *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu den, nur in der frühen Phase der Invasion sekretierten MIC- und ROP-Proteinen, erfolgt die Sekretion der GRA-Proteine (GRA1-9) kontinuierlich in die ausgebildete Parasitophore Vakuole. Die in den Dichten-Granula von *T. gondii* angereicherten GRA-Proteine werden historisch den sekretorischen Antigenen (excreted-secreted-antigens; ESA) zugeordnet (Lecordier *et al.*, 1999). Sie werden nach der Invasion der Wirtszelle ausgehend vom apikalen Pol des Parasiten in die PV freigesetzt (Dubremetz *et al.*, 1993; Leriche und Dubremetz, 1990) und stellen starke Stimuli des Immunsystems dar (Duquesne *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu den Mikronemen- und den Rhoprien-Proteinen, deren Funktion bei der Invasion der Wirtszelle weitestgehend geklärt ist, gibt es über die genaue Funktion der GRA-Proteine bis jetzt lediglich unvollständige Daten. Sie induzieren z.B. spezifische Modifikationen der PV (Achbarou *et al.*, 1991; Cesbron-Delauw, 1994; Mercier *et al.*, 2002) und sind in den Stoffaustausch zwischen Wirtszelle und Parasit involviert (Sinai *et al.*, 1997).

Für das im Vorfeld dieser Arbeit von unserer Arbeitsgruppe neu charakterisierte Protein GRA9 lagen zu Beginn der Arbeit keine funktionellen Daten vor. Aufgrund der Lokalisation dieses Proteins in der Parasitophoren Vakuole und der hauptsächlichlichen Assoziation mit dem tubulovesikulären Netzwerk (Adjogble *et al.*, 2004), konnte vermutet werden, dass das Protein möglicherweise am Stoffaustausch zwischen Wirtszelle und Parasit beteiligt ist.

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit lag darin, zu analysieren ob das „Targeting“ von GRA9 in der Parasitophoren Vakuole (PV) sowie die Assoziation von GRA9 mit membranösen Strukturen innerhalb der PV über charakteristische Proteindomänen oder Sequenzbereiche des

GRA9-Proteins erfolgt. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, zu analysieren ob GRA9 mit anderen Proteinen in der Parasitophoren Vakuole interagiert und möglicherweise funktionelle Komplexe ausbildet.

### **5.1. Charakterisierung von spezifischen Proteindomänen innerhalb der GRA9-Sequenz**

Der aus 954 bp bestehende ORF des GRA9-Gens kodiert für 318 Aminosäuren, woraus sich das theoretisch errechnete Molekulargewicht von 41 kD für das überwiegend hydrophile Protein ergibt. Da bereits bekannt war, dass insbesondere hydrophobe und amphiphile Domänen in den GRA-Proteinen für Interaktionen mit Membranen von Bedeutung sind, wurde nun in dieser Arbeit das GRA9-Protein auf definierte bedeutsame hydrophobe Molekülbereiche hin untersucht.

Zunächst konnte eine hydrophobe Domäne von neunzehn Aminosäuren im Amino-Terminus des Proteins lokalisiert werden, die als Signalpeptid fungiert. Alle bereits bekannten GRA-Proteine von *T. gondii* weisen diese klassische N-terminale Sequenz auf. Über die Signalsequenz wird die gezielte Translokation des Proteins in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ermöglicht und die Sequenz schließlich abgespalten (Kaasch und Joiner., 2000). Eine Vermittlung bei der Membran-Assoziation ist somit für diese Sequenz auszuschließen.

Des Weiteren wurden zwei hydrophobe Alpha-Helices an Position 202-214 und 253-264 identifiziert. Im Gegensatz zu den Proteinen GRA3–GRA8, die in ihrer Sequenz die Existenz von hydrophoben Transmembrandomänen aufweisen über die sie an Membranen der PV binden (Mercier *et al.*, 2005), kann es sich bei den hydrophoben Regionen von GRA9 nicht um Transmembrandomänen handeln. Mit einer Länge von dreizehn bzw. zwölf Aminosäuren, sind die hydrophoben Domänen des GRA9-Proteins zu kurz, um den Kohlenwasserstoffkern der Phospholipid-Doppelschicht von Membranen durchspannen zu können. Somit können die Domänen zwar für hydrophobe Wechselwirkungen zur Verfügung stehen, ermöglichen jedoch keine Bindung von GRA9 als integrales Membranprotein.

Neben den klassischen hydrophoben Bereichen existieren weitere Domänen, die Membran-Interaktionen vermitteln können. So können z.B amphiphile Alpha-Helices Interaktionen ausbilden und sind durch die Ausrichtung ihrer hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren zu Wechselwirkungen mit Membranen befähigt. Sie sind ein häufig auftretendes Motiv in der

Sekundärstruktur von Proteinen, die in Zellmembranen Poren oder Kanäle ausbilden. Dabei formen die hydrophilen Seitenketten die Innenseite der Membranpore, um den Transfer von wasserlöslichen Molekülen und Ionen zu gewährleisten. Mit den hydrophoben Seitenketten liegt die Pore verankert in der Lipidmembran vor. GRA9 besitzt neben den bereits beschriebenen hydrophoben Bereichen eine zentrale amphiphile Alpha-Helix bestehend aus zwanzig Aminosäuren in der Position 82-101 der Aminosäuresequenz.

Die Bedeutung amphiphiler Alpha-Helices bei GRA-Proteinen ist insbesondere für GRA2 erforscht. GRA2 weist drei hintereinander gelegene amphipathische Alpha-Helices auf. Es konnte gezeigt werden, dass diese amphipathischen Alpha-Helices essentiell für eine stabile Assoziation von GRA2 an die membranöse Netzwerkstruktur innerhalb der PV sind (Mercier *et al.*, 1998; Sibley *et al.*, 1995; Travier *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Vorbefunde wurde vermutet, dass die Insertion des Proteins GRA9 ebenfalls auf das Vorhandensein der amphipathischen Alpha-Helix zurückzuführen ist.

Die weitere Analyse der GRA9-Aminosäuresequenz mit dem Programm PEST-Find (Rechsteiner und Rogers, 1996), führte zur Identifizierung einer PEST-Sequenz im C-terminalen Bereich von GRA9. PEST-Domänen, zeichnen sich durch eine Anhäufung von sauren Aminosäuren wie Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin aus, die einen Einfluss auf die Halbwertszeit des Proteins ausüben können (Rogers *et al.*, 1986).

Des Weiteren wird postuliert, dass die Proline im PEST-Motiv an Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt sein können (Kay *et al.*, 2000; Lety *et al.*, 2001). Auch die Serine in der PEST-Domäne sind essentiell für Protein-Wechselwirkungen. In der Uracil-Permease von *Saccharomyces cerevisiae* beispielsweise sind die Serine von Bedeutung für eine erfolgreiche Phosphorylierung und Ubiquitinierung des Proteins und ermöglichen damit die Aufnahme von Uracil (Marchal *et al.*, 1998).

Die im C-Terminus von GRA9 identifizierte PEST-Sequenz hatte einen sogenannten *score* von 5,62. Das Programm PEST-Find definiert einen *score* mit einem Wert größer als 5 als interessante und Einfluss nehmende PEST-Sequenz.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die amphiphile Alpha-Helix, die zwei hydrophoben Domänen und die PEST-Sequenz von GRA9 als bedeutsame Domänen für weitere Analysen hinsichtlich der Interaktionsfähigkeit von GRA9 mit membranösen Strukturen innerhalb der PV ausgewählt.

## 5.2. Funktionelle Folgen der Überexpression der GRA9-myc-Fusionsproteine in *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten

Um die Signifikanz der identifizierten Domänen in Bezug auf die Membran-Interaktion von GRA9 zu untersuchen, wurden GRA9-myc-Mutanten hergestellt, in denen die vier verschiedenen potentiellen Interaktionsdomänen jeweils einzeln deletiert wurden.

Die Konstruktion von Fusionsproteinen mit angefügtem myc-Epitop ist bereits in einer Vielzahl von zellbiologischen Studien von *T. gondii* zum Einsatz gekommen (Karsten *et al.*, 1997; Mattsson und Soldati, 1999) und ermöglichte in dieser Arbeit den gezielten Nachweis der modifizierten GRA9-Konstrukte trotz der Gegenwart des endogenen, nativen GRA9-Proteins.

Eine Überexpression von modifizierten Proteinen kann auch in Gegenwart des nativen Proteins einen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *T. gondii* ausüben. Dies ist beispielsweise für das Protein Rab6 beschrieben, das in *T. gondii* als Regulator des Proteintransports zwischen den Zisternen des Golgi-Apparats und den Dichten-Granula fungiert. Eine Überexpression des Proteins Rab6 führte, trotz der Gegenwart des nativen Rab6, zu einem Fehltransport der Proteine zu den Dichten-Granula und damit zu einer Reduktion des GRA-Protein-Gehalts (Stedman *et al.*, 2002).

Ein ähnliches Ergebnis konnte in unserer Arbeitsgruppe durch die Überexpression des zytoplasmatischen *T. gondii*-Proteins B4 herausgearbeitet werden. Parasiten, die das zusätzliche B4-Protein exprimierten, wiesen Störungen im Zytoskelett auf. Zudem wurden bei der Zellteilung vermehrt so genannte Residualbodies gebildet (A. Ailyati, Dissertation 2005).

Im Gegensatz zu den Proteinen Rab6 und B4 führt die Überexpression der GRA9-Mutanten GRA9-myc, GRA9 $\Delta$ AH-myc, GRA9 $\Delta$ HH1-myc, GRA9 $\Delta$ HH2-myc und GRA9 $\Delta$ PEST-myc in den Tachyzoiten zu keiner Beeinflussung des Proliferationsverhaltens (Abb. 4.6). Bei einer mikroskopischen Analyse konnten zudem keine Unterschiede bei der Ausbildung der Parasitophoren Vakuole im Vergleich mit dem RH-Wildtypstamm identifiziert werden (Abb. 4.7).

Dabei ist zu beachten, dass eine mögliche Beeinflussung des Wachstumsverhaltens aufgrund der deletierten amphiphilen Alpha-Helix, der hydrophoben Domänen, sowie der PEST-Domäne in den Mutanten durch das endogene GRA9-Protein maskiert sein könnte. Im Allgemeinen ist jedoch der fehlende Einfluss der GRA9-Mutationen auf das Parasitenwachstum nicht überraschend. Wie in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte,

weisen auch Mutanten, denen komplette GRA-Gene fehlen (GRA2, GRA4, GRA5, GRA6), ein unverändertes *in vitro*-Proliferationsverhalten auf (Mercier *et al.*, 2002).

### 5.3. Analyse des Lösungsverhaltens von GRA9-myc-Fusionsproteinen innerhalb der Dichten-Granula

Apikomplexa zeichnen sich durch einen hoch spezialisierten Sekretionsmechanismus aus. Im frühen Stadium des Sekretionswegs erfolgt der Transport der *T. gondii*-Proteine in Vesikeln vom ER zum Golgi-Apparat (Soldati *et al.*, 1998; Karsten *et al.*, 1998). Die Verschmelzung der Vesikel mit dem Golgi-Apparat bzw. mit dem ER wird über spezifische Hüllproteine gewährleistet, die Homologien zu COP I- und COP II-Vesikeln höherer Eukaryoten aufweisen (Hager *et al.*, 1999; Ajioka *et al.*, 1998). Im Golgi-Apparat erfolgt, wie in höheren eukaryotischen Zellen, die gezielte Modifizierung der Proteine. Je nach späterer Funktion werden weitere Proteine oder unterschiedliche Zuckerreste (N- bzw. O-Glykosylierung) angefügt (Schwarz und Tomavo, 1993) bzw. die Struktur des Proteins verändert. Nach vollständiger Modifizierung erfolgt das „Targeting“ aller bekannten sekretorischen Proteine zu den sekretorischen Organellen von *T. gondii*: den Mikronemen, Rhoptrien und Dichten-Granula. Der Transport des Proteins ROP2 zu den Rhoptrien erfolgt dabei z.B. gezielt über ein spezifisches Tyrosin-Motiv (YXXØ), das in der Aminosäuresequenz zu finden ist (Hoppe *et al.*, 2000). Tyrosin-Motive erwiesen sich ebenfalls als „Targeting“-Signal der MIC-Proteine (Kaasch und Joiner, 2000). Im Prozess des „Targeting“ besitzen die Dichten-Granula eine Sonderstellung. Lösliche Proteine, ohne jegliche „Targeting“-Information werden automatisch zu den Dichten-Granula transportiert (Karsten *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 1998). Dies gilt auch für die hier analysierten GRA9-myc-Fusionsproteine GRA9ΔAH-myc, GRA9ΔHH1-myc, GRA9ΔHH2-myc und GRA9ΔPEST-myc, die in Immunoblotanalysen in den Dichten-Granula nachgewiesen werden konnten (Abb.4.8).

Die Dichten-Granula dienen *T. gondii* zur längerfristigen Lagerung der sekretorischen Proteine in konzentrierter Form, die dann je nach Bedarf vom Parasiten sezerniert werden. Die Existenz von Dichten-Granula beschränkt sich dabei nicht ausschließlich auf Vertreter des Stammes der Apikomplexa. Dichte-Granula sind ebenfalls in sekretorischen Zellen, wie beispielsweise den neuroendokrinen und exokrinen Drüsenzellen von Säugetieren zu finden. Innerhalb dieser Dichten-Granula liegen die Proteine, stabilisiert durch hydrophobe und hydrophile Interaktionen, wie in *T. gondii* vor (Colomer *et al.*, 1996). Die Exozytose, d.h. die regulierte

Freisetzung der GRA-Proteine in die Parasitophore Vakuole, erfolgt am apikalen Pol des Parasiten. Die Dichten-Granula durchqueren dafür den Inneren Membrankomplex unterhalb der Plasmamembran, bevor sie durch Fusion mit der Plasmamembran ihren Inhalt sezernieren (Dubremetz *et al.*, 1993). Der gezielte Transport sowie die Membranfusion der Dichten-Granula werden über Membranproteine reguliert, die in der Membran der Dichten-Granula (DG) verankert sind (Dannies, 2003). Eine Sekretion der GRA-Proteine in die PV erfolgt im Gegensatz zur Anreicherung der GRA-Proteine in den DGs nur in der freien Form (Lecordier *et al.*, 1999). Das Protein GRA2 wird als freies Protein in multi-lamellaren Vesikeln verpackt und ist am posterioren Pol an der Invagination des Parasiten beteiligt (Sibley *et al.*, 1995; Labruyère *et al.* 1999).

Für die Proteine GRA2 (Mercier *et al.*, 1998) und GRA5 (Lecordier *et al.*, 1999) konnte gezeigt werden, dass sie innerhalb der sekretorischen Organellen als freie und als aggregierte Proteine vorliegen. Anders als die Proteine GRA2 und GRA5 existieren die GRA-Proteine GRA1 und GRA3 in den DGs nur in einer freien Form (Ossorio *et al.*, 1994).

Für GRA9 konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Protein sowohl in freier, als auch in aggregierter Form in den Dichten-Granula extrazellulärer Tachyzoiten vorkommt (Adjogble *et al.*, 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob das Lösungs- und Interaktionsverhalten des GRA9-Proteins durch die amphiphile Alpha-Helix, die hydrophoben Domänen bzw. die PEST-Domäne determiniert ist.

In Löslichkeitsanalysen wurden die verschiedenen GRA9-myc-Fusionsproteine bezüglich ihrer hydrophilen oder hydrophoben Affinität aufgetrennt und konnten alle sowohl in der wässrigen, als auch in der detergenten Phase nachgewiesen werden (Abb.4.8). GRA9 liegt, unabhängig von der jeweiligen deletierten Domäne, sowohl als aggregiertes, als auch als freies Protein in den DGs vor. Auffallend war bei diesen Analysen jedoch, dass sich die Proteine der GRA9 $\Delta$ HH2-myc- und GRA9 $\Delta$ PEST-myc-Mutanten leicht verstärkt in der wässrigen Phase detektieren ließen. Diese Verschiebung ist jedoch erklärlich, da durch die Deletion z.B. der HH2-Region die Hydrophilie des Restproteins zunimmt.

Der fehlende Effekt der Deletion der amphipathischen Alpha-Helix von GRA9 in den Untersuchungen dieser Arbeit kontrastierte zu den für GRA2 in der Literatur dokumentierten Befunden. Dieses Protein enthält drei amphipathische Alpha-Helices. Eine Deletion der ersten sowie eine Doppelmutation der ersten beiden Alpha-Helices des GRA2-Proteins führen zu einem vollkommenen Verlust der Aggregation von GRA2 in den Dichten-Granula. GRA2 $\Delta\alpha$ 1-



und GRA2 $\Delta\alpha$ 1+2-Mutanten existieren in den DGs ausschließlich als freie Proteine (Mercier *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu zeigt die alleinige Deletion der zweiten amphiphilen Alpha-Helix jedoch keinen Einfluss auf die hydrophile bzw. hydrophobe Affinität des Proteins. GRA2 $\Delta\alpha$ 2 liegt innerhalb der DGs weiterhin als freies und als aggregiertes Protein vor. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht jede amphiphile Alpha-Helix einen Einfluss auf das Lokalisationsverhalten bzw. vielmehr auf das Lösungsverhalten des Proteins ausübt.

Da eine alleinige Deletion der amphiphilen Alpha-Helix, der hydrophoben Domänen oder auch der PEST-Region das Aggregationsverhalten von GRA9 nicht beeinflussen, kann vermutet werden, dass keine dieser Regionen alleine für das Aggregationsverhalten verantwortlich ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die vier verschiedenen Regionen gemeinsam, oder in unterschiedlichen Kombinationen, für die beobachteten Interaktionen verantwortlich sind. Um allerdings weiter differenzieren zu können, ob die amphiphile Alpha-Helix in Verbindung mit den hydrophoben Domänen an der Übermittlung der Membran-Assoziation beteiligt ist, oder ob die Assoziation über andere GRA9-Sequenzbereiche erfolgt, bedarf es zusätzlicher Versuche. Eine mögliche Strategie wäre, GRA9-Deletionsmutanten zu konstruieren, in denen die charakteristischen Domänen unterschiedlich kombiniert deletiert werden oder in denen einzelne Aminosäureaustausche vorgenommen werden, die die Affinität des Proteins bzw. die Hydrophilie oder Hydrophobie beeinflussen.

#### **5.4. Analyse der subzellulären Verteilung von GRA9-myc-Fusionsproteinen innerhalb der Parasitophoren Vakuole**

GRA-Proteine werden als lösliche Proteine in die Parasitophore Vakuole sezerniert und dann zielgerichtet zu unterschiedlichen Lokalisationsorten in der PV transportiert. Welche Faktoren die Exozytose der Dichten-Granula auslösen, konnte bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden. *In vitro* kann die Sekretion der GRA-Proteine durch FCS induziert werden (Darcy *et al.*, 1988). Die sonst häufig in diesen Prozessen involvierten Komponenten cAMP und Ca<sup>2+</sup> haben auf die Sekretion der GRA-Proteine keinen stimulatorischen Effekt (Coppens *et al.*, 1999; Chaturvedi *et al.*, 1999). Nach der Sekretion werden die GRA9-Proteine zielgerichtet zum membranösen Netzwerk und zur PVM transportiert, wo sie mit den Membranen interagieren (Adjogble *et al.*, 2004). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte kein Signal für das gerichtete „Targeting“ des GRA9-Proteins identifiziert werden.

Ausgehend von den sekretorischen Organellen können andere Sequenzmotive, als die zuvor aufgelisteten, das „Targeting“ der *T. gondii*-Proteine signifikant beeinflussen. Nach der Sekretion als lösliches Protein fungiert ROP2 als integrales Membranprotein in der PVM. Die Sekretion in die PV und die Anlagerung an membranöse Strukturen erfolgt hier unabhängig vom Tyrosin-Motiv. Mit seiner NH<sub>2</sub>-terminalen Domäne interagiert das Protein mit den Mitochondrien der Wirtszelle und sichert die Anlagerung dieser Wirtsorganellen an die PVM von *T. gondii* (Sinai und Joiner 2001). Für die Insertion des Proteins GRA2 in das Netzwerk innerhalb der PV ist die Existenz der amphiphilen Alpha-Helices essentiell (Mercier *et al.*, 1998, Travier *et al.*, 2007), die Anlagerung von GRA3 an die PVM erfolgt dagegen über hydrophobe Wechselwirkungen (Oligomerisation) (Ossorio *et al.*, 1994). Wieder anders verhält sich das Protein GRA5, das mit einer Transmembrandomäne die Phospholipid-Doppelschicht der PVM durchspannt und mit seinem C-Terminus in das Lumen der PV und mit seinem N-Terminus in das Zytosol der Wirtszelle ragt (Lecordier *et al.*, 1999).

Da die GRA9-Aminosäuresequenz keinen hydrophoben Transmembranbereich enthält, lag in Analogie zu den Literaturbefunden über GRA2 die Vermutung nahe, dass die Alpha-helikale (Mercier *et al.*, 1998; Travier *et al.*, 2007) Domäne oder die hydrophoben Sequenzbereiche an der Bindung an das Netzwerk bzw. die PVM beteiligt sein könnten. Daher wurde die subzelluläre Verteilung der GRA9-myc-Fusionsproteine im Vergleich zu endogenem GRA9 nach der Sekretion in die PV über eine Immunfluoreszenzanalyse mikroskopisch ausgewertet. In der Immunfluoreszenz zeigte sich das Verteilungsmuster von GRA9 unbeeinflusst von einer Deletion der amphiphilen Alpha-Helix bzw. der hydrophoben Domänen im C-Terminus. Die deletierten Proteinvarianten von GRA9 zeigen, wie endogenes GRA9, eine gleichmäßige Lokalisation in der Parasitophoren Vakuole sowie angereichert am posterioren Pol im Bereich des membranösen Netzwerks sowie an der PVM (Abb. 4.9 und 4.10). Immunfluoreszenzanalysen können jedoch nur grob orientierend zur Beurteilung der exakten Lokalisation von Proteinen herangezogen werden. Das „Targeting“ der Proteine in die PV und die spätere Membranassoziation mit Strukturen innerhalb der PV können durch vollkommen unabhängige Mechanismen reguliert werden (Mercier *et al.*, 1998). Demnach besteht die Möglichkeit, dass GRA9 trotz Deletion der putativen „Targeting“-Signale erfolgreich in die PV sekretiert wird, die anschließende Assoziation mit Membranen innerhalb der PV jedoch gestört ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, waren detaillierte Fraktionierungsanalysen erforderlich.

Durch Ultrazentrifugation wurden die membranösen Strukturen in der PV angereichert und auf die Interaktion mit den GRA9-myc-Fusionsproteinen hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass GRA9-myc, sowie die Deletionsmutanten GRA9 $\Delta$ AH-myc, GRA9 $\Delta$ HH1-myc, GRA9 $\Delta$ HH2-myc und GRA9 $\Delta$ PEST-myc überwiegend als lösliche Proteine in der PV lokalisiert sind, jedoch auch Membran-assoziiert vorkommen (Abb. 4.12). Die nähere Analyse des GRA9-Verteilungsmusters ergab, dass GRA9-myc-Proteine, welchen entweder eine der hydrophoben Domänen oder die PEST-Region fehlen, eine geringere Membran-Assoziationsfähigkeit aufweisen. Dieser Befund korreliert gut mit dem beschriebenen Löslichkeitsverhalten der verschiedenen GRA9-myc-Fusionsproteine (Abb. 4.8).

Eine Deletion der hydrophoben Domänen, des überwiegend hydrophilen Proteins führt erwartungsgemäß zu einer Zunahme der Löslichkeit, wie sie für GRA9 $\Delta$ HH1-myc, GRA9 $\Delta$ HH2-myc und GRA9 $\Delta$ PEST-myc auch detektiert werden konnte.

Überraschend war bei diesen Analysen ebenfalls der fehlende Einfluss der amphiphilen Alpha-Helix im GRA9 $\Delta$ AH-myc-Protein. Im Gegensatz zu den Befunden mit GRA2 ist die amphiphile Alpha-Helix in GRA9 nicht für die Assoziation mit membranösen Strukturen essentiell (Mercier *et al.*, 1998). Die detaillierte Analyse der drei amphiphilen Alpha-Helices von GRA2 zeigte, dass die alleinige Existenz der dritten amphiphilen Alpha-Helix für eine Membran-Assoziation von GRA2 sowie für die Formation der Membranvesikel in der PV verantwortlich ist. Jedoch führt erst eine Kombination der N-terminalen Region von GRA2 mit allen drei Alpha-Helices zu einer uneingeschränkten Ausbildung der Netzwerkstruktur und somit zur Formation und Organisation der Parasiten innerhalb der PV (Travier *et al.*, 2007).

Eine Stabilitätsanalyse der nachgewiesenen GRA9-Membran-Assoziation mit denaturierenden Agenzien wie Harnstoff (Urea) oder NP40 (Nonidet P40) ergab, dass GRA9 zum größten Teil mit Harnstoff und NP40 aus der Membranbindung gelöst werden kann. Die Behandlung mit Natrium-Carbonat und Kaliumchlorid zeigte dagegen nur geringfügige, von der Kontrolle (Tris- und PBS-Puffer) nicht unterscheidbare Veränderungen. Eine ähnlich starke Membran-Assoziation ist auch für das Netzwerk-assoziierte GRA2 und das in der PVM integrierte Protein GRA5 beschrieben. Beide lassen sich nur durch die Verwendung von NP-40 aus den Membranen lösen (Mercier *et al.*, 2002).

Eine qualitativ ähnlich stabile Membran-Assoziation konnte auch für die GRA9-myc-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die quantitativen Unterschiede, die insbesondere mit den GRA9-myc-Fusionsproteinen mit deletierten hydrophoben Regionen gefunden wurden, sind schwer interpretierbar, da wie im Material- und Methodenteil beschrieben mehrere

Reinigungsschritte zur Gewinnung des Rohmaterials notwendig sind, und somit leichte Schwankungen bei den Präparationen quantitative Unterschiede erklären können.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der bisherigen Befunde sagen, dass die identifizierten potentiellen Interaktionsdomänen von GRA9 das exakte „Targeting“ des Proteins nicht beeinflussen aber einen, wenn auch geringen, Effekt auf die Membran-Interaktion des GRA9 – Proteins besitzen. Nach diesen Befunden sind die Analysen weiterer Deletionsmutanten erforderlich, um das „Targeting“-Verhalten und das Membran-Assoziationsverhalten von GRA9 endgültig zu klären.

### **5.5. GRA9 interagiert mit anderen GRA-Proteinen innerhalb der Parasitophoren Vakuole**

Das exakte „Targeting“ von Toxoplasmen-Proteinen in die sekretorischen Organellen und in der Parasitophoren Vakuole ist teilweise über die Proteinstruktur selbst vorgegeben. Des Weiteren beeinflussen auch Protein-Protein-Interaktionen das gezielte „Targeting“ zum Zielorganell bzw. regulieren die biologische Wirkung verschiedener Proteine im Rahmen der Wirtszell-Invasion. So zeigte sich eine Interaktion der Proteine MIC1 und MIC4 mit MIC6 als relevant für die korrekte Zielsteuerung zu den Mikronemen (Reis *et al.*, 2001).

Protein-Protein Interaktionen liefern darüber hinaus wichtige Anhaltspunkte für die Bedeutung und biologische Funktion eines Proteins innerhalb des Organismus. Aus diesem Grund stand zusätzlich die Suche nach Interaktionspartnern von GRA9 im Fokus dieser Arbeit. Protein-Protein Interaktionen werden meist über nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten der beteiligten Proteine vermittelt, wodurch es zu Konformationsänderungen, und damit verbunden zu Funktionsänderungen der Proteine kommen kann. In vorangegangenen Studien konnte die Anwesenheit der Mikronemenproteine MIC1, MIC4 und MIC6 als trimerer Komplex im Rahmen der *T. gondii*-Infektion nachgewiesen werden (Reis *et al.*, 2001). Die Proteine MIC1 und MIC4 fungieren dabei als Adhäsine (Soldati *et al.*, 2001), die maßgeblich an der Invasion des Parasiten beteiligt sind. Das Protein MIC6 agiert innerhalb des Komplexes mit MIC1 und MIC4 als ein so genannter „escorter“, wodurch die richtige Anordnung der Proteine MIC1 und MIC4 gewährleistet wird. Einen weiteren Protein-Protein-Komplex zwischen sekretorischen Proteinen in *T. gondii* bilden GRA2, GRA4 und GRA6 aus (Labruyère *et al.*, 1999), die alle mit dem Netzwerk-assoziiert sind. Das Protein GRA2 ist dabei essentiell für die Ausbildung der intravakuolären Netzwerkstruktur innerhalb der PV, die

durch GRA6 stabilisiert wird (Mercier *et al.*, 2002). Die Abwesenheit eines der beiden Interaktionspartner GRA2 bzw. GRA6 führt zur fehlenden Ausbildung bzw. Missbildung des tubulovesikulären Netzwerks (Mercier *et al.*, 2002), was die biologische Relevanz dieses Komplexes verdeutlicht.

GRA9 ist nach unseren Befunden ebenfalls am Netzwerk der Parasitophoren Vakuole zu finden, daher war eine Analyse möglicher Interaktionspartner von GRA9 von großem Interesse. Da GRA9 nicht über charakteristische Sequenzdomänen an die Membranen der PV zu binden scheint, erscheint es unter diesen Gesichtspunkten möglich, dass GRA9 über Protein-Protein-Interaktionen an die membranösen Strukturen innerhalb der PV sowie der DGs angebunden wird. Zur Klärung dieser Fragestellung, wurden Interaktionsstudien auf Basis von Immunfluoreszenzanalysen (IFA) sowie Co-Immunpräzipitationsassays (Co-IP) zwischen GRA9 und anderen GRA-Proteinen, die am Netzwerk sowie an der PVM lokalisiert sind, durchgeführt. Diese Analysen führten zur Identifikation von GRA1, GRA3 und GRA5 als potentielle Interaktionspartner von GRA9 innerhalb der Parasitophoren Vakuole. Weitere Befunde zeigen, dass die identifizierten GRA9-Interaktionspartner GRA1, GRA3 und GRA5 untereinander ebenfalls Interaktionen in der PV ausbilden (Abb. 4.16). Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Proteine GRA1, GRA3, GRA5 und GRA9 in diesem Kompartiment als putativer Protein-Komplex vorliegen.

Wie Abbildung 4.14 und 4.15 zeigen, ist GRA9 mit GRA1 in der Parasitophoren Vakuole nicht nur nahezu perfekt co-lokalisiert, sondern geht auch direkt Interaktionen mit GRA1 ein. GRA1 ist wie GRA9 ein überwiegend hydrophiles Protein ohne putative Transmembrandomäne. GRA1 verbleibt jedoch, im Gegensatz zu GRA9, nach der Sekretion im Lumen der PV (Sibley *et al.*, 1995) und geht keine Membranbindung ein.

Eine weitere Interaktion konnte zwischen GRA9 und GRA3 sowie GRA9 und GRA5 beobachtet werden. Hier zeigte die Immunfluoreszenz lediglich eine partielle Co-Lokalisation der Proteine, während die Immunpräzipitation eindeutig eine direkte Interaktion der Proteine nachwies. GRA5 und GRA3 besitzen beide, im Gegensatz zu GRA9, eine Transmembrandomäne mit der sie, nach der Sekretion in die PV, mit der Membran der Parasitophoren Vakuole interagieren (Ossorio *et al.*, 1994; Lecordier *et al.*, 1999).

Die Co-Lokalisation der Membran-gebundenen Proteine GRA3 und GRA5 mit GRA9 in der IFA stützen die bisherigen Daten zur GRA9-Lokalisation mittels Immun-Elektronenmikroskopie, die gebundenes GRA9 am Netzwerk sowie an der PVM zeigen (Adjogble *et al.*, 2004). Die Lokalisation eines Proteins an verschiedenen membranösen

Strukturen, wie hier für GRA9 beschrieben, ist bei Toxoplasmen-Proteinen keine Seltenheit. Die Proteine GRA3 und GRA7 weisen ebenfalls eine Lokalisation sowohl an der PVM als auch am Netzwerk auf (Mercier *et al.*, 2005).

Die erhobenen Daten zu einer Komplexbildung zwischen GRA1, GRA3, GRA5 und GRA9 korrelieren mit den Befunden, die von der Arbeitsgruppe Mercier (Universität Joseph Fourier, Grenoble) erhoben wurden. „Protein-sizing“-Analysen, basierend auf *T. gondii*-Lysat konnten zeigen, dass GRA-Proteine innerhalb des Parasiten in Komplexen mit einem hohen Molekulargewicht vorliegen. Für das Protein GRA9 wurde ein Elutionsprofil als Komplex mit einer Größe von 400 kD erstellt (Braun *et al.*, 2008). Diese Befunde stützen die Annahme, dass GRA9, Interaktionen mit anderen Proteinen innerhalb des Parasiten eingeht. Über welche Mechanismen und Sequenzen diese GRA-Interaktionen jedoch vermittelt werden, ist noch unklar. Die Formation des schon länger bekannten GRA2-GRA4-GRA6-Komplexes innerhalb der PV erfolgt zwischen GRA2 und GRA4 über starke Protein-Protein-Interaktionen, wohingegen die Anbindung von GRA6 überwiegend auf hydrophobe Wechselwirkungen beruht (Labruyère *et al.*, 1999). Protein-Protein-Interaktionen und hydrophobe Wechselwirkungen sind auch für die Ausbildung des putativen GRA9-GRA5-GRA3-GRA1-Komplexes denkbar. Ob die Proteine direkt interagieren, sterische Verbindungen eingehen können, lediglich in enger Assoziation vorliegen oder wirklich einen stabilen Komplex ausbilden, wird sich nur eindeutig durch weitere, detaillierte Untersuchungen belegen lassen. Ein möglicher Ansatzpunkt dafür wäre der Nachweis eines solchen Komplexes im nativen Gel. Die Möglichkeit, dass eine GRA9-Interaktion mit anderen GRA-Proteinen ausschließlich über die amphiphile Alpha-Helix bzw. die hydrophoben Domänen ermöglicht wird, konnte ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse mit den GRA9-myc-Fusionsproteinen zeigen, dass eine Interaktion zwischen GRA1 und GRA9 sowie GRA5 und GRA9 erfolgt, auch wenn die oben genannten Proteindomänen deletiert wurden (Abb. 4.20).

Die Definition der Bedeutung von GRA9 für *T. gondii* war eines der Teilziele dieser Arbeit. Die Existenz eines putativen Komplexes bestehend aus GRA1, GRA3, GRA5 und GRA9 lässt Rückschlüsse auf eine denkbare Funktion des Proteins zu. Vorbefunden zufolge unterstützen GRA-Proteine den Transport essentieller Moleküle zwischen Parasit und Wirtszelle (Sibley *et al.*, 1994). PVM-interagierende GRA-Proteine unterstützen in diesem Zusammenhang möglicherweise die Ausbildung von Poren in der PVM durch die (nach Daten von Schwab *et al.*, 1994) eine Passage von Nährstoffen in einer Größenordnung von 1300-1900 Dalton gewährleistet wird.

Durch die Interaktion des Membran-durchspannenden Proteins GRA5 mit den an der Innenseite der PVM angelagerten Proteinen GRA3 und GRA9, sowie dem in der PV lokalisierten Protein GRA1 könnte ferner auch die Einschleusung von Wirtszellmolekülen gesteuert werden. Protein-Komplexe zur gezielten Aus- und Einschleusung von Molekülen sind weit verbreitet. So translozieren z. B. *Yersinia enterocolitica*-Bakterien im Verlauf einer Infektion mit Hilfe ihres Typ-III-Sekretionssystems Yop-Virulenzproteine direkt in das Zytoplasma der Wirtszellen. Die Translokation der Yop-Proteine in die Zielzelle erfolgt durch einen sogenannten „Nadelkomplex“ (Ysc-Injektisom), der die bakterielle Zellwand, die Bakterienmembranen sowie die Wirtszellmembran durchspannt (Cornelis, 2002). Der ausgebildete Komplex wird durch insgesamt 27 Proteine aufgebaut. Der Nadelkomplex fungiert wie eine molekulare Spritze, über die bakterielle Effektorproteine ausgeschleust werden.

Neben der Annahme, dass die Lokalisation von GRA9 an der PVM an der Aufnahme von Nährstoffen beteiligt ist, kann auch das am membranösen Netzwerk gebundene GRA9 Aufgaben beim Nährstofftransport übernehmen. Die tubulovesikulären Strukturen des Netzwerks, die das Lumen der PV durchspannen, sind direkt mit der Membran der Parasitophoren Vakuole verbunden und bewirken so eine Vergrößerung der Austauschoberfläche zwischen der Wirtszelle und dem Parasiten (Sibley *et al.*, 1995; Carruthers und Sibley, 1997). Neben der Funktion als Transferfläche für zytoplasmatische Komponenten, dient das Netzwerk auch als strukturelles Gerüst innerhalb der PV, wodurch die gerichtete Anordnung der Tachyzoiten bei der Endodyogenie, in der für *T. gondii* typischen Rosettenform, gewährleistet wird (Magno *et al.*, 2005).

Auf Basis der in dieser Arbeit dargestellten Co-Immunpräzipitationsanalysen konnte eine direkte Interaktion zwischen GRA9 und dem Netzwerk-assoziierten Protein GRA2 ausgeschlossen werden. Dieser eindeutige Befund unterscheidet sich dabei von bereits publizierten Daten, die auf Affinitätschromatographischen Analysen mit HA-FLAG-markiertem GRA2 beruhen. Auf Basis dieser Methode wurde nachgewiesen, dass GRA2-HA-FLAG innerhalb der PV mit verschiedenen GRA-Proteinen assoziiert. Als Haupt-Interaktionskomponenten wurden die Proteine GRA3, GRA6 und GRA7 identifiziert, schwächere Interaktionen zeigt GRA2-HA-FLAG mit den Proteinen GRA1 und GRA9 (Braun *et al.*, 2008). Die differenten Befunde, die mit verschiedenen Reinigungsmethoden erhalten wurden, beruhen möglicherweise darauf, dass bei der Verwendung affinitätschromatographischer Methoden vermehrt „unspezifische“ Interaktionen, auch mit geringer

Bindungsstärke auftreten, die unter normalen Bedingungen im *T. gondii*-Lysat mit der Co-Immunpräzipitationsanalyse nicht erfasst werden.

### 5.6. „Targeting“ und Lokalisation von GRA9 in Abwesenheit des Interaktionspartners GRA5

Um der Existenz und der Bedeutung eines möglichen GRA-Komplexes näher auf den Grund zu gehen, wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteine GRA1 und GRA9 innerhalb der PV sowie in extrazellulären Parasiten in Abwesenheit des Interaktionspartners GRA5 untersucht. Die Verwendung von knock-out-Mutanten wird in *T. gondii* vielfach genutzt, um die Funktion eines Proteins in Bezug auf die Pathogenese des Parasiten näher aufzuklären. Somit konnte beispielsweise durch Konstruktion von *Δgra2*-Mutanten u. a. eine essentielle Rolle des Proteins GRA2 im Rahmen der *in vivo*-Infektion nachgewiesen werden. In Mäusen führte die Abwesenheit von GRA2 zur Verminderung der Virulenz in der akuten Infektionsphase mit resultierendem Anstieg der chronischen Infektion durch den sonst hoch virulenten RH-Stamm von *T. gondii* (Mercier *et al.*, 1998). Des Weiteren erfolgte durch GRA2-KO-Mutanten der Nachweis, dass GRA2 ein essentielles Protein zur Ausbildung des tubulovesikulären Netzwerks ist, welches sich in Abwesenheit von GRA2 nur durch die Ansammlung von granulärem Material in der PV auszeichnet.

Mit GRA3 und GRA5 konnten weitere GRA-Proteine erfolgreich ausgeschaltet werden. In den GRA3-defizienten Parasiten werden insbesondere GRA2 und GRA7 erfolgreich in die PV sekretiert und weisen eine unveränderte Assoziation mit dem Netzwerk bzw. der PVM auf (Craver und Knoll, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir GRA3 als einen Interaktionspartner von GRA9 identifizieren. Für die detaillierte Analyse des GRA9-Verteilungsmusters stand uns aber leider die *Δgra3*-Mutante nicht zur Verfügung.

In weiteren Vorbefunden konnte mit GRA5-Knock-out-Mutanten gezeigt werden, dass ein Mangel an GRA5, im Gegensatz zu GRA2, keine Virulenzverminderung in der akuten Infektionsphase von *T. gondii* verursacht (Mercier *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde in Immunfluoreszenzanalysen, sowie in Triton-X-114-Extraktionen nachgewiesen, dass trotz der Abwesenheit des Proteins GRA5, die Expression sowie die Verteilung der Proteine GRA2 bis GRA7 in der Parasitophoren Vakuole unverändert erfolgt (Mercier *et al.*, 2001).

Basierend auf diesen Literaturdaten wurde in dieser Arbeit die Proteinverteilung von GRA1 bzw. GRA9 in *T. gondii*-Tachyzoiten in Abwesenheit ihres Interaktionspartners GRA5 mittels



Immunfluoreszenz- und detaillierter Fraktionierungsanalyse unter Nutzung einer *Δgra5*-Mutante (GRA5-KO) analysiert. Auf Basis beider Analysemethoden konnte keine Veränderung der GRA1- und GRA9-Sekretion, sowie der Protein-Assoziation mit membranösen Strukturen innerhalb der PV nachgewiesen werden (Abb. 4.17-4.19). Zusätzlich zeigte die Feinfraktionierung von extrazellulärem *T. gondii*-Lysat sowie von Lysat der Parasitophoren Vakuole ebenfalls keine Veränderung des Verteilungsmusters von GRA1 und GRA9 innerhalb der Dichten-Granula sowie innerhalb der PV bei GRA5-KO-Parasiten. Basierend auf diesen Ergebnissen ist eine essentielle Funktion von GRA5 in Bezug auf die Lokalisation sowie das „Targeting“ der Interaktionspartner GRA1 und GRA9 auszuschließen. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das Protein GRA5 für die Ausbildung und Funktionalität des putativen GRA-Komplexes aus GRA1, GRA3, GRA5 und GRA9 nicht essentiell ist.

Für eine Funktionsanalyse des putativen GRA9-Proteinkomplexes wären Untersuchungen mit GRA1- und GRA9-defizienten Mutanten von höchstem Interesse, um die Formation und das „Targeting“ des Komplexes um GRA9 zu untersuchen. Jedoch zeigten bis zum heutigen Zeitpunkt alle Versuche in unserer Arbeitsgruppe, dass die GRA9-Deletion eine letale Mutation ist. Eine Beschreibung letaler Mutanten gestaltet sich schwierig. Das negative Kulturergebnis kann einerseits durch das Ausschalten eines essentiellen Gens bedingt sein, oder aber durch toxische Effekte bei der Selektion der Mutanten erklärt werden. Für die *Δgra9*-Mutante konnten diese unspezifischen Effekte jedoch ausgeschlossen werden. Als Kontrolle konnten parallel bekanntermaßen vitale *Δgra2*-Mutanten mit identischen Kulturmethode erzeugt werden. Entsprechend der vorliegenden Ergebnisse handelt es sich bei GRA9 daher um ein essentielles Protein, dass signifikant an der Entwicklung des Parasiten beteiligt ist.

Auch für den dritten ermittelten Interaktionspartner von GRA9, das GRA1 sind Knock-out-Parasiten bis jetzt nicht beschrieben. Aus zur Verfügung stehenden, bisher nicht veröffentlichten Daten verschiedener Arbeitsgruppen kann man schließen, dass es sich bei GRA1, ebenso wie bei GRA9, um ein essentielles Protein von *T. gondii* handelt, dessen Fehlen einen Letalfaktor für *T. gondii* darstellt.

### **5.7. Redundante Funktion der Interaktionsdomänen oder funktionelle Bedeutung der flankierenden Proteinregionen im GRA9 Molekül?**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde, basierend auf Daten, die mit anderen GRA-Proteinen bereits erhoben wurden, hypothetisch angenommen, dass die amphiphile Alpha-Helix, bzw. die hydrophoben Proteinbereiche oder die PEST-Region an der Membranbindung von GRA9 beteiligt sind. Wie die bisher diskutierten Ergebnisse belegen, ist jedoch keine der vier Regionen alleine für die Interaktionsfähigkeit von GRA9 verantwortlich zu machen. Daraus ist zu schließen, dass diese Regionen z.T. funktionell redundant sind bzw. andere Molekülbereiche für die nachgewiesene Membranbindung bzw. Protein-Protein-Interaktion essentiell sind. Bei einer detaillierten Analyse der bisher vorgestellten Daten konnten lediglich geringfügige Effekte nach einer Deletion der PEST- bzw. der hydrophoben Proteinbereiche gefunden werden. Daher erschien es sinnvoll, mehrere dieser Bereiche gleichzeitig zu deletieren. Dazu wurden zwei neue GRA9-Protein-Mutanten hergestellt denen die letzten 65 (GRA9 $\Delta$ 253-318) bzw. 117 Aminosäuren (GRA9 $\Delta$ 202-318) im C-terminalen Bereich fehlen. Die GRA9 $\Delta$ 253-318-Mutante zeichnet sich durch einen Verlust sowohl der PEST- als auch der zweiten hydrophoben Region aus, während in dem GRA9 $\Delta$ 202-318-Protein beide hydrophoben Domänen gemeinsam mit der PEST-Region deletiert wurden. Diese mutierten Proteine zeigen im Vergleich zum Wildtyp-Protein sowohl eine gestörte Verteilung innerhalb der Parasitophoren Vakuole als auch eine reduzierte Fähigkeit zur Bildung von Protein-Protein-Komplexen. So kann das um 65 Aminosäuren verkürzte GRA9 $\Delta$ 253-318-Protein eine vergleichsweise normale Interaktion mit GRA1 eingehen, assoziiert aber nur noch schwach mit GRA5. Dagegen hat das GRA9 $\Delta$ 202-318-Protein seine Interaktionsfähigkeit mit GRA5 und GRA1 nahezu verloren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass GRA9 $\Delta$ 253-318 normal in die Parasitophore Vakuole sezerniert wird, jedoch nach der Sekretion verstärkt in der Nähe der Tachyzoiten verbleibt. Bei der noch stärker verkürzten GRA9 $\Delta$ 202-318-Mutante scheint bereits die Protein-Sekretion gestört, was daran zu erkennen ist, dass GRA9 $\Delta$ 202-318 verstärkt im Inneren der intrazellulären Tachyzoiten verbleibt. Diese Ergebnisse können als ein Hinweis darauf gesehen werden, dass die aus anderen GRA-Proteinen bekannten, potentiellen Interaktionsregionen in Kombination für das beobachtete Sekretions- und Interaktionsverhalten von GRA9 verantwortlich sind. Jedoch muss dabei beachtet werden, dass bei diesen Mutationen nicht nur die identifizierten Molekülbereiche, sondern auch die jeweils flankierenden Regionen deletiert wurden. Es ist also möglich, dass diese flankierenden Bereiche für das „Targeting“- und Sekretionsverhalten von Bedeutung sind.

Eine genaue Analyse des C-terminalen Bereichs von GRA9 auf Basis des NetPhos 2.0 Sequenz-Analyseprogramms führte zur Identifizierung von zwanzig putativen Phosphorylierungsstellen, bei denen es sich um dreizehn mögliche Serin-, sechs Threonin- und eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle handelt. Phosphorylierungen erfolgen hauptsächlich an Aminosäuren, die OH-Gruppen in der Seitenkette besitzen, wie es bei Tyrosin, Serin und Threonin der Fall ist. Dabei stellt Serin die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure dar. Durch Tyrosin-, Serin-, bzw. Threoninkinasen werden Phosphatgruppen kovalent an diese Aminosäurereste angebunden, wobei in den meisten Fällen die Übertragung der Phosphatgruppe von ATP als Substrat erfolgt. Auffällig ist, dass die Phosphorylierungsstellen von GRA9 nicht gleichmäßig über die Sequenz verteilt sind, sondern dass sechzehn der zwanzig potentiellen Phosphorylierungsstellen im mittleren bis C-terminalen Sequenzbereich von GRA9 angereichert vorliegen. Die hohe Anzahl an Phosphorylierungsstellen in der GRA9-Sequenz spricht dafür, dass das Protein GRA9 in signifikante biologische Prozesse von *T. gondii* involviert sein könnte. Jedoch muss festgestellt werden, dass die tatsächliche Phosphorylierung dieser Aminosäuren in dem GRA9-Protein noch nicht nachgewiesen wurde. Aktive Phosphorylierungsprozesse konnten bei GRA-Proteinen von *T. gondii* bereits beschrieben werden. Die Proteine GRA6 und GRA7 werden nach Sekretion in die Parasitophore Vakuole durch Anbindung von Phosphatgruppen modifiziert, bevor sie mit Membranen der PV assoziieren. (Labruyère *et al.*, 1999; Neudeck *et al.*, 2002). Mittels Western-Blot Analysen wurde der Nachweis einer unphosphorylierten Proteinform sowie eines höher laufenden phosphorylierten Proteins im *T. gondii* Lysat erbracht. Welche Auswirkungen die Phosphorylierung auf die Funktionalität der Proteine GRA6 und GRA7 hat und ob die Assoziation mit dem Netzwerk bzw. der PVM zusätzlich unterstützt wird, konnte bisher nicht geklärt werden.

Zusätzlich ist bekannt, dass Protein-Protein-Interaktionen gezielt über Phosphorylierungen reguliert werden, was einen interessanten Ansatzpunkt für eine Erklärung der Interaktion des GRA9-Proteins mit den GRA-Proteinen GRA1, GRA3 und GRA5 darstellen könnte.

In den C-terminal verkürzten GRA9-Proteinen sind in der GRA9 $\Delta$ 253-318-Mutante vier Serin- sowie zwei Threonin-Phosphorylierungsstellen und im GRA9 $\Delta$ 202-318-Protein vier Threonin-, vier Serin- und die einzige Tyrosin-Phosphorylierungsstelle deletiert. Durch Phosphorylierung erfolgt im Allgemeinen die Regulation von biologischen Prozessen innerhalb einer Zelle. Die Protein-Phosphorylierung ist meist mit einer Konformationsänderung des Proteins verbunden, durch die das Protein von der inaktivierten Form in eine aktive Form umgewandelt wird. So

können Phosphorylierungen gezielt das An- und Ausschalten von Enzymaktivitäten bewirken. Eine weitere Form der Einflussnahme durch Phosphorylierungen ist, dass gezielt Proteinbindestellen reguliert werden, über die eine Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt wird. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass über eine gezielte Phosphorylierung der Serine oder der Threonine die Anbindung des Proteins GRA9 an andere GRA-Proteine oder an Membranen ermöglicht wird. Dies könnte bedeuten, dass die bei GRA9 $\Delta$ 202-318 beobachtete reduzierte Sekretion durch eine Störung der Phosphorylierung bedingt ist.

Zusammenfassend erlauben die bisher erhobenen Daten die Feststellung, dass der C-Terminus das „Targeting“ sowie die Sekretion des GRA9-Proteins signifikant beeinflusst. Welche Funktion den putativen Phosphorylierungsstellen dabei zukommt, kann bis jetzt noch nicht bewertet werden. Um die direkte und modulatorische Wirkung der einzelnen Phosphorylierungsstellen zu analysieren, und um auszuschließen, dass die Veränderungen generell über die Deletionen des C-Terminus von GRA9 bedingt sind, müssen gezielt Punktmutationen in die GRA9-Sequenz eingebracht werden. Ferner wäre es sinnvoll die verschiedenen hydrophoben Molekülregionen und die PEST-Domäne kombiniert und darüber hinaus unter Erhalt der flankierenden Regionen zu deletieren. Diese Analysen weiterer GRA9-Mutanten mit definierten Punktmutationen und weiteren Deletionen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen, sollen aber im Mittelpunkt zukünftiger Analysen zur Funktion von GRA9 stehen.

## 6. Zusammenfassung

*T. gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit und Verursacher einer humanmedizinisch relevanten Zoonose. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde GRA9 als ein neues sekretorisches Protein von *T. gondii* beschrieben. Das Ziel dieser Arbeit war es, dieses neu identifizierte, hauptsächlich an membranösen Strukturen lokalisierte GRA9-Protein biochemisch und funktionell bezüglich seines „Targeting“ in der Parasitophoren Vakuole (PV), seiner Membran-Assoziation sowie seines Protein-Interaktionsverhaltens zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GRA9 mit GRA1 innerhalb der PV und auch mit GRA3 und GRA5 interagiert, die beide an der Membran der Parasitophoren Vakuole lokalisiert sind. Weitere Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz- und Co-Immunpräzipitationsanalysen führten zu dem Ergebnis, dass die identifizierten GRA9-Interaktionspartner auch untereinander interagieren und damit *in vivo* wahrscheinlich als multimolekulare GRA1-, GRA3-, GRA5- und GRA9-Komplexe vorliegen.

Aus Literaturbefunden ist bekannt, dass Alpha-helikale Strukturen bzw. hydrophobe Aminosäuresequenzen und potentiell auch PEST-Regionen das Interaktionsverhalten von Proteinen determinieren. Durch Analyse selbst erzeugter GRA9-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die potentiellen Interaktionsdomänen im GRA9-Molekül jeweils nicht alleine für das Interaktionsverhalten von GRA9 innerhalb der Parasitophoren Vakuole als auch mit den identifizierten Interaktionspartnern verantwortlich sind. Diese Befunde wurden zusätzlich durch Zellfraktionierungsmethoden und Western-Blot-Analysen bestätigt. Erst eine Deletion mehrerer Bereiche, die durch eine C-terminale Verkürzung von GRA9 erzielt wurde, führte zu einer deutlichen Veränderung des Interaktionsverhaltens von GRA9. Die C-terminalen Verkürzungen zeichnen sich durch den Verlust von zwei hydrophoben Domänen einschließlich der PEST-Domäne bzw. einer hydrophoben Domänen sowie der PEST-Sequenz aus. Beide verkürzten Proteine zeigen deutliche Veränderungen im Interaktionsverhalten, wie z.B. die abgeschwächte Fähigkeit zur Interaktion mit anderen GRA-Proteinen, ein gestörtes „Targeting“ in der Parasitophoren Vakuole oder eine gestörte Sekretion in das Lumen der Parasitophoren Vakuole.

Die Identifikation von Interaktionspartnern von GRA9 und von funktionellen Sequenzbereichen innerhalb des GRA9-Proteins, die das „Targeting“- und Membranbindungsverhalten von GRA9 beeinflussen, ist ein wichtiger Schritt zum Verständnis der physiologischen Aufgabe von GRA9 beim Stoffaustausch zwischen Parasit und Wirtszelle.

## 7. Summary

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite that causes persistent infections in a broad range of warm-blooded vertebrates, including human beings. Since prior research described GRA9 as a new secretory protein of *T. gondii*, which is mainly localised at the parasitophorous vacuole (PV) membranes, the objective of this PhD-thesis was to biochemically and functionally characterise the targeting behaviour of GRA9 within the PV, its association with the membranes and the protein-interaction of this newly identified protein.

In this study we were able to detect an interaction between GRA9 and GRA1, which remains primarily in the lumen of the PV and between GRA9 and the PV-membrane-associated proteins GRA5 and GRA3. Further immunofluorescence analysis and co-immunoprecipitation assays demonstrated that the identified GRA9-interaction partners GRA1, GRA3 and GRA5 bind to each other as well. These results indicate that GRA1, GRA3, GRA5 and GRA9 are closely associated with each other and exist probably *in vivo* as multimeric complexes.

From previously published findings it is known, that alpha-helical structures, as well as hydrophobic amino acid sequences and potentially PEST-regions, determine protein-protein interactions. Based on constructed GRA9 deletion mutants we showed that each potential domain of GRA9 was neither individually responsible for the GRA9 interaction behaviour within the parasitophorous vacuole nor with the identified GRA9 interaction partners. These findings were confirmed by cell fractionation assays and western blot analysis. Only the deletion of multiple domains, created by the construction of GRA9 mutant forms truncated in its c-terminus, led to a significant change of the interaction behaviour of GRA9. The c-terminal truncated GRA9 constructs lead to a loss of either one or both hydrophobic domains as well as the PEST-domain. Both truncated proteins exert a distinct influence on the interaction behaviour of GRA9, for example a weaker interaction ability with other GRA proteins, a disturbed targeting within the parasitophorous vacuole or a disturbed secretion into the lumen of the PV.

The identification of interaction partners as well as functional domains of GRA9, which influence the GRA9 targeting and membrane association is an important step to understand the function of GRA9 in nutrient transport between the parasite and the host cell.

## 8. Literaturverzeichnis

Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D., Dubremetz, J. F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. Parasitology. 3, 321-329.

Adjogble, K. D., Mercier, C., Dubremetz, J. F., Hucke, C., MacKenzie, C. R., Cesbron-Delauw, M. F., Däubener, W. (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. Int. J. Parasitol. 34, 1255-1264.

Ailyati, A. (2005). B4: Ein neues Antigen von *Toxoplasma gondii* mit "coiled-coil"-Struktur: Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung. Inaugural-Dissertation, unveröffentlicht.

Ajioka, J. W. (1998). *Toxoplasma gondii*: ESTs and gene discovery. Int. J. Parasitol. 28, 1025-1031.

Ajioka, J. W., Boothroyd, J. C., Brunk, B. P., Hehl, A., Hillier, L., Manger, I. D., Marra, M., Overton, G. C., Roos, D. S., Wan, K. L., Waterston, R., Sibley, L. D. (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the apicomplexa. Genome Research. 8, 18-28.

Ajioka, J. W., Fitzpatrick, J. M., Reitter, C. P. (2001). *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert. Rev. Mol. Med. 3, 1-19.

Allan, B. B., Balch, W. E. (1999). Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. Science. 285, 63-66.

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

Aramini, J. J., Stephen, C., Dubey, J. P., Engelstoft, C., Schwantje, H., Ribble, C. S. (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. Epidemiol. Infect. 122, 305-315.

Asai, T., Miura, S., Sibley, L. D., Okabayashi, H., Takeuchi, T. (1995). Biochemical and molecular characterization of nukleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 270, 11391-11397.

Bannister, L. H., Mitchell, G. H. (1995). The role of the cytoskeleton in *Plasmodium falciparum* merozoite biology: an electron-microscopic view. Ann. Trop. Med. Parasitol. 89, 105-111. Review.

**Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P., Cowman, A. F. (2006).** Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 621-628.

**Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O., Joiner, K. A. (1994).** The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell. Biol.* 127, 947-961.

**Bermudes, D., Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Joiner, K. A. (1994).** Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 68, 247-257.

**Bermudes, D., Peck, K. R., Afifi, M. A., Beckers, C. J., Joiner, K. A. (1994).** Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 269, 29252-29260.

**Black, M. W., Boothroyd, J. C. (2000).** Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 607-623.

**Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D. J., Heesemann, J. (1995).** Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bagl) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol. Microbiol.* 16, 1221-1230.

**Bohne W., Holpert, M., Gross, U. (1999).** Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology.* 20, 248-254. Review.

**Bonhomme, A., Bouchot, A., Pezzella, N., Gomez, J., Le Moal, H., Pinon, J. M. (1999).** Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 551-561. Review

**Bordier, C. (1981).** Phase separation of integral membrane proteins in Triton-X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607.

**Bouchot, A., Millot, J. M., Charpentier, S., Bonhomme, A., Villena, I., Aubert, D., Pinon, J. M. (2001).** Membrane potential changes after infection of monocytes by *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1114-1120.

**Bradley, P. J., Boothroyd, J. C. (2001).** The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Int. J. Parasitol.* 31, 1177-1186.

**Braun, L., Travier, L., Kieffer, S., Musset, K., Garin, J., Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F. (2008).** Purification of *Toxoplasma* dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 13-21.



**Brecht, S., Carruthers, V. B., Ferguson, D. J., Giddings, O. K., Wang, G., Jakle, U., Harper, J. M., Sibley, L. D., Soldati, D. (2001).** The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J. Biol. Chem.* 276, 4119-4127.

**Bumstead, J. & Tomley, F. (2000).** Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 311-321.

**Burg, J. L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L., Boothroyd, J. C. (1988).** Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141, 3584-3591.

**Carey, K. L., Donahue, C. G., Ward, G. E. (2000).** Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105, 25-37.

**Carruthers, V. B., Sibley, L. D. (1997).** Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 114-123.

**Carruthers, V. B. (1999).** Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol. Int.* 48, 1-10.

**Carruthers, V. B., Sibley, L. D. (1999).** Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 31, 421-428.

**Carruthers, V. B., Sherman, G. D., Sibley, L. D. (2000).** The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J. Biol. Chem.* 275, 14346-14353.

**Cesbron-Delauw, M. F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R. J., Lenzen, G., Cesbron, J. Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J. P., Capron, A. (1989).** Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 7537-7541.

**Cesbron-Delauw, M. F. (1994).** Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol. Today.* 10, 293-296.

**Cesbron-Delauw, M. F., Tomavo, S., Beauchamps, P., Fourmaux, M. P., Camus, D., Capron, A., Dubremetz, J. F. (1994).** Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 269, 16217-16222.

**Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M. F., Capron, A. (1990).** *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 71, 114-124.

- 
- Charron, A. J., Sibley, L. D. (2002).** Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. J. Cell. Sci. 115, 3049-3059.
- Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P. I., Striepen, B., Roos, D. S., Joiner, K. A. (1999).** Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. J. Biol. Chem. 274, 2424-2431.
- Chou, P. Y., Fasman, G. D. (1978).** Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 47, 45-148.
- Colomer, V., Kicska, G. A., Rindler, M. J. (1996).** Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. J. Biol. Chem. 271, 48-55.
- Coppens, I., Andries, M., Liu, J. L., Cesbron-Delauw, M. F. (1999).** Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. Eur. J. Cell. Biol. 78, 463-472.
- Coppin, A., Dzierszynski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Ferguson, D., Tomavo, S. (2003).** Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. Biochimie. 85, 353-361.
- Cornelis, G. R. (2002).** *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. J. Cell. Biol. 158, 401-408.
- Cornelissen, A. W., Overdulve, J. P., van der Ploeg, M. (1984).** Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. Parasitology. 88, 531-553.
- Couvreux, J., Desmonts, G., Thulliez, P. (1988).** Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. J. Antimicrob. Chemother. 22, 193-200.
- Craver, M. P., Knoll, L. J. (2007).** Increased efficiency of homologous recombination in *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 demonstrates that GRA3 is not necessary in cell culture but does contribute to virulence. Mol. Biochem. Parasitol. 153, 149-157.
- Dannies, P. (2003).** Manipulating the reversible aggregation of protein hormones in secretory granules: potential impact on biopharmaceutical development. BioDrugs. 17, 315-324.

- 
- Dao, A., Soète, M., Sergent, V., Deslée, D., Fortier, B., Dubremetz, J. F. (2002).** Potential of beta-galactosidase-expressing *Toxoplasma gondii* for in situ localization and observation of rare stages of the parasite life cycle. *Parasitol. Res.* 88, 69-72.
- Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V., Capron, A. (1988).** Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite. Immunol.* 10, 553-567.
- Darcy, F., Maes, P., Gras-Masse, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslee, D., Godard, I., Cesbron-Delauw, M. F., Tartar, A., Capron, A. (1992).** Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.* 149, 3636-3641.
- Dardé, M. L., Bouteille, B., Pestre-Alexander, M. (1992).** Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78, 786-794.
- Delbac, F., Sander, A., Neuhaus, E. M., Stratmann, R., Ajioka, J. W., Toursel, C., Herm-Gotz, A., Tomavo, S., Soldati, T., Soldati, T. (2001).** *Toxoplasma gondii* myosins B/C: one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J. Cell. Biol.* 155, 613-623.
- Denton, H., Roberts, C. W., Alexander, J., Thong, K. W., Coombs, G. H. (1996).** Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 137, 103-108.
- Desmonts, G., Couvreur, J. (1974).** Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.* 290, 1110-1116.
- Desmonts, G., Naot, Y., Remington, J. S. (1981).** Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J. Clin. Microbiol.* 14, 486-491.
- Djurković-Djaković, O. (1995).** *Toxoplasma* infection and pathological outcome of pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 40, 36-41.
- Dobrowolski, J. M., Sibley, L. D. (1996).** *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84, 933-939.
- Dobrowolski, J. M., Niesman, I. R., Sibley, L. D. (1997).** Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 37, 253-262.

- 
- Donald, R. G., Roos, D. S. (1993).** Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11703-11707.
- Donald, R. G., Roos, D. S. (1994).** Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase locus in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63, 243-253.
- Donald, R. G., Carter, D., Ullman, B., Roos, D. S. (1996).** Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J. Biol. Chem.* 271, 14010-14019.
- Dubey, J. P. (1994).** Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205, 1593-1598. Review.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Speer, C. A. (1998).** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 267-299. Review.
- Dubremetz, J. F., Torpier, G. (1978).** Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *J. Ultrastruct. Res.* 62, 94-109.
- Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., Joiner, K. A. (1993).** Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol. Res.* 79, 402-408.
- Dubremetz, J. F., Schwartzman, J. D. (1993).** Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res. Immunol.* 144, 31-33. Review.
- Dubremetz, J. F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M. N. (1998).** Apical organelles and host –cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28, 1007-1013.
- Dubremetz, J. F. (1998).** Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends. Microbiol.* 6, 27-30. Review.
- Duquesne, V., Aurialt, C., Darcy, F., Decavel, J. P., Capron, A. (1990).** Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T-cells. *Infect. Immun.* 58, 2120-2126.
- Dynan, W. S., Saffer, J. D., Lee, W. S., Tjian, R. (1985).** Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4915-4919.
- Erlich, H. A., Gelfand, D., Sninsky, J. J. (1991).** Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science.* 252, 1643-1651.

- 
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S. T., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J. F. (2007).** ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog. 3, 200-211.
- Entzeroth, R., Kerckhoff, H., Konig, A. (1992).** Microneme secretion in Coccidia: confocal laser scanning and electron microscope study of *Sarcocystis muris* in cell culture. Eur. J. Cell. Biol. 59, 405-413.
- Feagin, J. E. (1992).** The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. Mol. Biochem. Parasitol. 52, 145-148.
- Feagin, J. E. (2000).** Mitochondrial genome diversity in parasites. Int. J. Parasitol. 30, 371-390. Review.
- Ferguson, D. J., Hutchison, W. M. (1987).** An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol. Res. 73, 483-491.
- Fichera, M. E., Roos, D. S. (1997).** A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. Nature. 390, 407-409.
- Fischer, H. G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H. E., Reichmann, G. (1998).** GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. Mol. Biochem. Parasitol. 91, 251-262.
- Fourmaux, M. N., Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Biderre, C., Briche, I., Loyens, A., Odberg-Ferragut, C., Camus, D., Dubremetz, J. F. (1996).** The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. Mol. Biochem. Parasitol. 83, 201-210.
- Frenkel, J. K., Dubey, J. P., Miller, N. L. (1970).** *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science. 167, 893-896.
- Frenkel, J. K. (1988).** Pathophysiology of toxoplasmosis. Parasitol. Today. 4, 273-278.
- Freyre, A., Dubey, J. P., Smith, D. D., Frenkel, J. K. (1989).** Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. J. Parasitol. 75, 750-755.
- Frixione, E., Mondragon, R., Meza, I. (1996).** Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. Cell. Motil. Cytoskeleton. 34, 152-163.
- Fuentes, I., Rubio, J. M., Ramirez, C., Alvar, J. (2001).** Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. J. Clin. Microbiol. 39, 1566-1570.

**Garcia-Reguet, N., Lebrun, M., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Mann, T., Beckers, C. J., Samyn, B., Van Beeumen, J., Bout, D., Dubremetz, J. F. (2000).** The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell. Microbiol.* 2, 353-364.

**Gleeson, M., T. (2000).** The plastid in Apicomplexa: what use is it ? *Int. J. Parasitol.* 30, 1053-1070.

**Goode, B. L., Drubin, D. G., Barnes, G. (2000).** Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12, 63-71. Review

**Gratzl, R., Hayde, M., Kohlhauser, C., Hermon, M., Burda, G., Strobl, W., Pollak, A. (1998).** Follow-up of infants with congenital toxoplasmosis detected by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 853-858.

**Grigg, M. E., Boothroyd, J. C. (2001).** Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 39, 398-400.

**Grigg, M. E., Bonnefoy, S., Hehl, A. B., Suzuki, Y., Boothroyd, J. C. (2001).** Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science.* 294, 161-165.

**Grimwood, J., Smith, J. E. (1996).** *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int. J. Parasitol.* 26, 169-173.

**Gross, U., Roggenkamp, A., Janitschke, K., Heesemann, J. (1992).** Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 33-39.

**Gross, U., Bohne, W. (1994).** *Toxoplasma gondii*: Strain- and Host Cell Dependent Induction of Stage differentiation. *J. Euk. Microbiol.* 41, 10S-11S.

**Gross, U., Bohne, W., Soete, M., Dubremetz, J. F. (1996).** Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today.* 12, 30-33.

**Guérardel, Y., Leleu, D., Coppin, A., Liénard, L., Slomianny, C., Strecker, G., Ball, S., Tomavo, S. (2005).** Amylopectin biogenesis and characterization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, the intracellular development of which is restricted in the HepG2 cell line. *Microbes. Infect.* 7, 41-48.

**Hager, K. M., Striepen, B., Tilney, L. G., Roos, D. S. (1999).** The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 112, 2631-2638.

- 
- Hakansson, S., Charron, A. J., Sibley, L. D. (2001).** *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. EMBO J. 20, 3132-3144.
- Hepler, P. K., Huff, C. G., Sprinz, H. (1966).** The fine structure of the exoerythrocytic stages of *Plasmodium fallax*. J. Cell. Biol. 30, 333-358.
- Hermentin, K., Aspöck, H. (1987).** Higher yields and increased purity of *in vitro* grown *Toxoplasma gondii*. Zentralbl. Bakteriол. Microbiol. Hyg. 267, 272-276.
- High, K. P., Joiner, K. A., Handschumacher, R. E. (1994).** Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 269, 9105-9112.
- Hoppe, H., Ngo, H., Joiner, K. A. (2000).** Targeting of rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionary conserved protein sorting mechanisms. Nat. Cell. Biol. 2, 449-456.
- Howe, D. K., Sibley, L. D. (1995).** *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J. Infect. Dis. 172, 1561-1566.
- Howe, D. K., Summers, B. C., Sibley, L. D. (1996).** Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 64, 5193-5198.
- Hu, S., Schwartzman, J. D., Kasper, L. H. (2001).** Apoptosis within mouse eye induced by *Toxoplasma gondii*. Chin. Med. J. (Engl.) 114, 640-644.
- Hu, K., Roos, D. S., Murray, J. M. (2002).** A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. J. Cell Biol. 156, 1039-1050.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D. S., Murray, J. M. (2006).** Cytoskeletal components of an invasion machine - the apical complex of *Toxoplasma gondii*. Plos. Pathog. 2, 121-138.
- Huynh, M. H., Rabenau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L., Sibley, L. D., Carruthers, V. B. (2003).** Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. EMBO J. 22, 2082-2090.
- Huynh, M. H., Carruthers, V. B. (2006).** *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. Plos Pathog. 2, 753-762.
- Israelski, D. M., Remington, J. S. (1993a).** Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. Curr. Clin. Top. Infect. Dis. 13, 322-356. Review.

- 
- Israelski, D. M., Remington, J. S. (1993b).** Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* 2, 423-435.
- Jacobs, L., Remington, J. S., Melton, M. L. (1960).** The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 46, 11-21.
- Jacobs, D., Dubremetz, J. F., Loyens, A., Bosman, F., Saman, E. (1998).** Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 237-249.
- Jerome, M. E., Radke, J. R., Bohne, W., Roos, D. S., White, M. W. (1998).** *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development. *Infect. Immun.* 66, 4838-4844.
- Joiner, K. A., Fuhrman, S. A., Miettinen, H. M., Kasper, L. H., Mellman, I. (1990).** *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249, 641-646.
- Joiner, K. A., Dubremetz, J. F. (1993).** *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect. Immun.* 61, 1169-1172. Review.
- Joiner, K. A., Roos, D. S. (2002).** Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J. Cell. Biol.* 157, 557-563.
- Jones, T.C., Hirsch, J.G. (1972).** The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* 136, 1173-1194.
- Jura, W. G., Brown, C. G., Rowland, A. C. (1983).** Ultrastructural characteristics of in vitro parasite-lymphocyte behaviour in invasions with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. *Vet. Parasitol.* 12, 115-134.
- Kaasch, A. J., Joiner, K. A. (2000).** Protein-targeting determinants in the secretory pathway of apicomplexan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 422-428.
- Karsten V, Qi H, Beckers CJ, Joiner KA. (1997).** Targeting the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. *Methods.* 13, 103-111.
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C. J., Reddy, A., Dubremetz, J. F., Webster, P., Joiner, K. A. (1998).** The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J. Cell. Biol.* 141, 1323-1333.
- Kasper, L. H. (1989).** Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 57, 668-672.



- 
- Kay, B. K., Williamson, M. P., Sudol, M. (2000).** The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14, 231-241. Review.
- Kayser, K., Zeilinger, C., Zeng, F. Y., Gabius, S., Gabius, H. J., Weiser, W. Y. (1993).** Detection of the lymphokine migration inhibitory factor in normal and disease-affected lung by antibody and by its major binding protein, the interferon antagonist sarcolectin. *Pathol. Res. Pract.* 189, 992-995.
- Kim, K., Soldati, D., Boothroyd, J. C. (1993).** Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science.* 262, 911-914.
- Kim, K., Weiss, L. M. (2004).** *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int. J. Parasitol.* 34, 423-432. Review.
- King, C. A. (1988).** Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitol. Today.* 4, 315-319.
- Köhler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., Roos, D. S. (1997).** A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science.* 275, 1485-1489.
- Koppe, J. G., Loewer-Sieger, D. H., de Roeper-Bonnet, H. (1986).** Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet.* 1, 254-256.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982).** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Labruyère, E., Lingnau, M., Mercier, C., Sibley, L. D. (1999).** Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 311-324.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lauer, S. A., Rathod, P. K., Ghori, N., Haldar K. (1997).** A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science.* 276, 1122-1125.
- Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J. L., Maes, P., Tartar, A., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F. (1993).** Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 143-153.

- Lecordier, L., Moleon-Borodowsky, I., Dubremetz, J. F., Tourvieille, B., Mercier, C., Deslee, D., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F. (1995).** Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70, 85-94.
- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D., Cesbron-Delauw, M. F. (1999).** Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell.* 10, 1277-1287.
- Lekutis, C., Ferguson, D. J., Boothroyd, J. C. (2000).** *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp. Parasitol.* 96, 89-96.
- Leriche, M. A., Dubremetz, J. F. (1990).** Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol. Res.* 76, 559-562.
- Lety, M. A., Frehel, C., Dubail, I., Beretti, J. L., Kayal, S., Berche, P., Charbit, A. (2001).** Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 39, 1124-1139.
- Levine, N. D. (1980).** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66, 830-834.
- Li, L., Brunk, B. P., Kissinger, J. C., Pape, D., Tang, K., Cole, R. H., Martin, J., Wylie, T., Dante, M., Fogarty, S. J., Howe, D. K., Liberator, P., Diaz, C., Anderson, J., White, M., Jerome, M. E., Johnson, E. A., Radke, J. A., Stoeckert, C. J. Jr, Waterston, R. H., Clifton, S. W., Roos, D. S., Sibley, L. D. (2003).** Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. *Genome Res.* 13, 443-454.
- Lindsay, D. S., Dubay, J. P., Blagburn, B. L., Toivio-Kinnucan, M. (1991).** Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites and sporozoites. *J. Parasitol.* 77, 126-132.
- Lingelbach, K., Joiner, K. A. (1998).** The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J. Cell. Sci.* 111, 1467-1475.
- Lourenco, E. V., Pereira, S. R., Faça, V. M., Coelho-Castelo, A. A., Mineo, J. R., Roque-Barreira, M. C., Greene, L. J., Panunto-Castelo, A. (2001).** *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology.* 11, 541-547.
- Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N., Sibley, L. D. (2002).** *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release from inositol-1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J. Biol. Chem.* 277, 25870-25876. Epub 2002 May 13.

**Luft, B. J., Remington, J. S. (1992).** Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin. Infect. Dis. 15, 211-222.

**Luft, B. J., Hafner, R., Korzun, A. H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E. M., Bourland, D. D., 3rd, Uttamchandani, R., Fuhrer, J., Jacobson, J., et al., (1993).** Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 007p/ANRS 009 Study Team. N. Engl. J. Med. 329, 995-1000.

**Magno, R. C., Lemgruber, L., Vommoro, R. C., De Souza, W., Attias, M. (2005).** Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. Microsc. Res. Tech. 67, 45-52.

**Marchal, C., Haguenauer-Tsapis, R., Urban-Grimal, D. (1998).** A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of Yeast uracil permease. Mol. Cell. Biol. 18, 314-321.

**Maréchal, E., Azzouz, N., de Macedo, C. S., Block, M.A., Feagin, J. E., Schwarz, R. T., Joyard, J. (2002).** Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. Eukaryot. Cell. 1, 653-656.

**Mattsson JG, Soldati D. (1999).** MPS1: a small, evolutionarily conserved zinc finger protein from the protozoan *Toxoplasma gondii*. FEMS Microbiol Lett. 180(2):235-239.

**McCabe, R., Remington, J. S. (1988).** Toxoplasmosis: the time has come. N. Engl. J. Med. 318, 313-315.

**Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shaoiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. (1999).** Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5, 607-625. Review.

**Ménard, R. (2001).** Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. Cell. Microbiol. 3, 63-73. Review.

**Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Deslee, D., Murray, A., Tourvieille, B., Maes, P., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F. (1993).** Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 58, 71-82.

**Mercier, C., Lefebvre-Van Hende, S., Garber, G. E., Lecordier, L., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F. (1996).** Common cis-acting elements critical for the expression of several genes of *Toxoplasma gondii*. Mol. Microbiol. 21, 421-428.

**Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., Sibley, L. D. (1998).** The amphipathic alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. J. Cell Sci. 111, 2171-2180.

- 
- Mercier, C., Howe, D. K., Mordue, D., Lingnau, M., Sibley, L. D. (1998).** Targeted disruption of the *GRA2* locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect. Immun.* 66, 4176-4182.
- Mercier, C., Rauscher, B., Lecordier, L., Deslée, D., Dubremetz, J. F., Cesbron-Delauw, M. F. (2001).** Lack of expression of the dense granule protein GRA5 does not affect the development of *Toxoplasma* tachyzoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 247-251.
- Mercier, C., Dubremetz, J. F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., Cesbron-Delauw, M. F. (2002).** Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell.* 13, 2397-2409.
- Mercier, C., Adjogble, K. D., Däubener, W., Delauw, M. F. (2005).** Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 35, 829-849. Review.
- Messina, M., Niesman, I., Mercier, C., Sibley, L. D. (1995).** Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using phleomycin selection. *Gene.* 165, 213-217.
- Mevelec, M. N., Chardes, T., Mercereau-Puijalon, O., Bourguin, I., Achbaron, A., Dubremetz, J. F., Bout, D. T. (1992).** Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 227-238.
- Michel, R., Schupp, K., Raether, W., Bierther, F. W. (1980).** Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int. J. Parasitol.* 10, 309-313.
- Mineo, J. R., McLeod, R., Mack, D., Smith, J., Khan, I. A., Ely, K. H., Kasper, L. H. (1993).** Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.* 150, 3951-3964.
- Mitchell, P. J. & Tjian, R. (1989).** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 245, 371-378.
- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., Sibley, L. D. (1999).** Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 190, 1783-1792.
- Mordue, D. G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. A., Sibley, L. D. (2001).** Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.* 167, 4574-4584.
- Morrisette, N. S., Bedian, V., Webster, P., Roos, D. S. (1994).** Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.* 79, 445-459.

- 
- Morrisette, N. S., Sibley, L. D. (2002).** Cytoskeleton of Apicomplexan parasites. *Micobiol. Mol. Biol.* 66, 21-38. Review.
- Morrisette, N. S., Sibley, L. D. (2002 b).** Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 115, 1017-1025.
- Nakaar, V., Bermudes, D., Peck, K. R., Joiner, K. A. (1998).** Upstream elements required for expression of nucleoside triphosphate hydrolase genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 229-239.
- Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G., Fischer, H. G. (2002).** Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes. Infect.* 4, 581-590.
- Ngo, H. M., Hoppe, H. C., Joiner, K. A. (2000).** Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends Cell. Biol.* 10, 67-72.
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L. (1987).** Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 34, 217-226.
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L., Pavesio, C. E. (1994).** Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 80, 91-98.
- Nicolle, C., Manceaux, L. (1908).** Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 148, 369-372.
- Nockemann, S., Dlugonska, H., Henrich, B., Kitzerow, A., Däubener, W. (1998).** Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen (ESA) from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97, 109-121.
- Ortega-Barria, E., Boothroyd, J. C. (1999).** A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J. Biol. Chem.* 274, 1267-1276.
- Ossorio, P. N., Dubremetz, J. F., Joiner, K. A. (1994).** A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J. Biol. Chem.* 269, 15350-15357.
- Parmley, S. F., Yang, S., Harth, G., Sibley, L. D., Sucharczuk, A., Remington, J. S. (1994).** Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66, 283-296.
- Parmley, S. F., Weiss, L. M., Yang, S. (1995).** Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 253-257.

- 
- Pettersen, E. K. (1979).** Destruction of *Toxoplasma gondii* by HCl solution. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [B]. 87, 217-220.
- Pfefferkorn, E. R., Pfefferkorn, L. C. (1977).** Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. J. Protozool. 24, 449-453.
- Pfefferkorn, E. R. (1990).** Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In: Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects. Wyler, D. J., Freeman, New York. 26-50.
- Pinon, J.M., Toubas, D., Marx, C., Mougeot, G., Bonnin, A., Bonhomme, A., Villaume, M., Foudrinier, F., Lèpan, H. (1990).** Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 28, 1739-1743.
- Porchet-Hennere, E., Nicolas, G. (1983).** Are rhoptries of Coccidia really extrusomes? J. Ultrastruct. Res. 84, 194-203.
- Radke, J. R., White, M. W. (1998).** A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. Mol. Biochem. Parasitol. 94, 237-247.
- Radke, J. R., Striëpen, B., Guerini, M. N., Jerome, M. E., Roos, D. S., White, M. W. (2001).** Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 115, 165-175.
- Rechsteiner, M., Rogers, S. W. (1996).** PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends. Biochem. Sci. 21, 267-271. Review
- Reichmann, G., Długonska, H., Fischer, H. G. (2002).** Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. Mol. Biochem. Parasitol. 119, 43-54.
- Reiss, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M. N., Soete, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J. F., Soldati, D. (2001).** Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. J. Cell. Biol. 152, 563-578.
- Robben, J., Hertveldt, K., Bosmans, E., Volckaert, G. (2002).** Selection and identification of dense granule antigen GRA3 by *Toxoplasma gondii* whole genome phage display. J. Biol. Chem. 277, 17544-17547.
- Roberts, F., Roberts, C. W., Johnson, J. J., Kyle, D. E., Krell, T., Coggins, J. R., Coombs, G. H., Milhous, W. K., Tzipori, S., Ferguson, D. J., Chakrabarti, D., McLeod, R. (1998).** Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. Nature. 393, 801-805.

- 
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. (1986).** Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. 234, 364-368.
- Roos, D. S., Donald, R. G., Morrisette, N. S., Moulton, A. L. (1994).** Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods. Cell. Biol.* 45, 27-63.
- Ruf, B., Pohle, H. D. (1995).** Therapie und Prophylaxe der Toxoplasmose bei HIV-Infektion. *AIFO*. 9, 479-490.
- Saffer, L. D., Schwartzman, J. D. (1991).** A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J. Protozool.* 38, 454-460.
- Saffer, L. D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J. F., Schwartzman, J. D. (1992).** Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* 39, 526-530.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239, 487-491.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., Joiner, K. A. (1994).** The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 509-513.
- Schwartzman, J. D., Pfefferkorn, E. R. (1982).** *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp. Parasitol.* 53, 77-86.
- Schwarz, R. T., Tomavo, S. (1993).** The current status of the glycobiology of *Toxoplasma gondii*: glycosylphosphatidylinositols, N- and O-linked glycans. *Res. Immunol.* 144, 24-31.
- Seeber, F. Boothroyd, J. C. (1996).** *Escherichia coli* beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene*. 169, 39-45.
- Sever, J. L., Ellenberg, J. H., Ley, A. C., Madden, D. L., Fuccillo, D. A., Tzan, N. R., Edmonds, D. M. (1988).** Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23,000 pregnancies. *Pediatrics*. 82, 181-192.
- Shaw, M. K., Tilney, L. G. (1992).** How individual cells develop from a syncytium: merogony in *Theileria parva* (Apicomplexa). *J. Cell. Sci.* 101, 109-123.
- Sheffield, H. G., Melton, M. L. (1968).** The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 54, 209-226.

- 
- Sibley, L. D., LeBlanc, A. J., Pfefferkorn, E. R., Boothroyd, J. C. (1992).** Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics*. 132, 1003-1015.
- Sibley, L. D., Boothroyd, J. C. (1992).** Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 291-300.
- Sibley, L. D., Messina, M., Niesman, I. R. (1994).** Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5508-5512.
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Asai, T., Takeuchi, T. (1994).** *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* 79, 301-311.
- Sibley, L. D. (1995).** Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends. Cell. Biol.* 103, 867-874.
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F., Cesbron-Delauw, M. F. (1995).** Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 108, 1669-1677.
- Sibley, L. D., Howe, D. K. (1996).** Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219, 3-15.
- Sibley, L. D., Hakansson, S., Carruthers, V. B. (1998).** Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr. Biol.* 8, R12-R14.
- Sibley, L. D., Mordue, D. G., Su, C., Robben, P. M., Howe, D. K. (2002).** Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357, 81-88.
- Sibley, L. D. (2003).** *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic*. 4, 581-486. Review.
- Sibley, L. D. (2004).** Intracellular parasite invasion strategies. *Science*. 304, 248-253. Review.
- Sinai, A. P., Webster, P., Joiner, K. A. (1997).** Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell Sci.* 110, 2117-2128.
- Sinai, A. P., Joiner, K. A. (2001).** The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell. Biol.* 154, 95-108.



- 
- Smith, J. E. (1995).** A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 25, 1301-1309. Review.
- Soete, M., Dubremetz, J. F. (1996).** *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 219, 76-80.
- Soldati, D., Boothroyd, J. C. (1993).** Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. Science. 260, 349-352.
- Soldati, D., Boothroyd, J. C. (1995).** A selector of transcription initiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Mol. Cell. Biol. 15, 87-93.
- Soldati, D., Kim, K., Kampmeier, J., Dubremetz, J. F., Boothroyd, J. C. (1995).** Complementation of a *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection. Mol. Biochem. Parasitol. 74, 87-97.
- Soldati, D. (1996).** Molecular genetic strategies in *Toxoplasma gondii*: close in on a successful invader. FEBS Lett. 389, 80-83. Review.
- Soldati, D., Lassen, A., Dubremetz, J. F., Boothroyd, J. C. (1998).** Processing of *Toxoplasma* ROP1 protein in nascent rhoptries. Mol. Biochem. Parasitol. 96, 37-48.
- Soldati, D. (1999).** The apicoplast as a potential therapeutic target in and other apicomplexan parasites. Parasitol. Today. 15, 5-7.
- Soldati, D., Dubremetz, J. F., Lebrun, M. (2001).** Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 31, 1293-1302. Review.
- Stedman, T. T., Sussmann, A. R., Joiner, K. A. (2002).** *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. J. Biol. Chem. 278, 5433-5443.
- Stokkermans, T. J., Schwartzman, J. D., Keenan, K., Morrisette, N. S., Tilney, L. G., Roos, D. S. (1996).** Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. Exp. Parasitol. 84, 355-370.
- Striepen, B., He, C. Y., Matrajt, M., Soldati, D., Roos, D. S. (1998).** Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 92, 325-338.
- Striepen, B., Crawford, M. J., Shaw, M. K., Tilney, L. G., Seeber, F., Roos, D. S. (2000).** The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. J. Cell. Biol. 151, 1423-1434.

**Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J. F., Roos, D. S. (2001).** Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 113, 45-53.

**Subauste, C. S., Remington, J. S. (1991).** Role of gamma interferon in *Toxoplasma gondii* infection. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10, 58-67. Review.

**Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., Ward, G. E. (1996).** *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 8413-8418.

**Swedlow, J. R., Hu, K., Andrews, P. D., Roos, D. S., Murray, J. M. (2002).** Measuring tubulin content in *Toxoplasma gondii*: a comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 2014-2019.

**Takahashi, E. E., Rossi, C. L. (1994).** Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* spIgA antibodies in acute toxoplasmosis. J. Clin. Pathol. 47, 1101-1104.

**Tanford, C., Nozaki, Y., Reynolds, J., A., Makino, S. (1974).** Molecular characterization of proteins in detergent solutions. Biochemistry. 13, 2369-2376.

**Tenant-Flowers, M., Boyle, M. J., Carey, D., Marriott, D. J., Harkness, J. L., Penny, R., Cooper, D. A. (1991).** Sulphadiazine desensitization in patients with AIDS and cerebral toxoplasmosis. AIDS 5, 311-315.

**Tomavo, S., Fortier, B., Soete, M., Ansel, C., Camus, D., Dubremetz, J. F. (1991).** Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 59, 3750-3753.

**Tomley, F. M., Bumstead, J. M., Billington, K. J., Dunn, P. P. (1996).** Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. Mol. Biochem. Parasitol. 79, 195-206.

**Travier, L., Mondragon, R., Dubremetz, J. F., Musset, K., Mondragon, M., Gonzales, s., Cesbron-Delauw, M. F., Mercier, C. (2007).** Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. Int. J. Parasitol. 38, 757-773.

**Vaidya, A. B., Akella, R., Suplick, K. (1989).** Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. Mol. Biochem. Parasitol. 35, 97-107.

**Van der Zypen, E., Piekarski, G. (1967).** Endodyogeny in *Toxoplasma gondii*. A morphological analysis. Z Parasitenkd. 29, 15-35.

---

**Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G. K., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S. (1998).** Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12352-12357.

**Wan, K. L., Carruthers, V. B., Sibley, L. D., Ajioka, J. W. (1997).** Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84, 203-214.

**Weiss, L. M., LaPlace, D., Tanowitz, H. B., Wittner, M. (1992).** Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 166, 213-215.

**Weiss, L. M., Kim, K. (2000).** The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front. Biosci.* 5, 391-405. Review

**Wong, S. Y., Remington, J. S. (1993).** Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 7, 299-316.

**Zenner, L., Darcy, F., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F. (1998).** *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp. Parasitol.* 90, 86-94.

## 9. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Walter Däubener für die fachliche und persönliche Betreuung dieser Arbeit, die vertrauensvolle Zusammenarbeit in den vergangenen drei Jahren und ganz besonders für das stete Verständnis und das immer offene Ohr in sämtlichen Belangen.

Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst danke ich für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ich möchte mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene an der Universität Düsseldorf anzufertigen.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für die immerwährende Hilfsbereitschaft und das außerordentlich gute Arbeitsklima, das wesentlich dazu beigetragen hat, dass ich diese Arbeit gerne am Institut angefertigt habe.

Dabei gilt mein ganz besonderer Dank allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Silvia Schmidt, Kathrin Heseler, Silke Stuhlsatz, Wilfried Schwippert, Vanessa Schwilski und Corinna Schwer. Sie standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite und haben mir die Arbeit auch in schweren Zeiten sehr erleichtert.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Koku D.Z. Adjogble für die Überlassung und Einarbeitung in das Thema der Toxoplasmose.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die stets an mich geglaubt und mich immer in jeder erdenklichen Art und Weise unterstützt haben und immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte. Ein besonderer Dank gilt auch meiner Schwester Heike für ihre Nähe und ihre seelische Unterstützung bei allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Sebastian Langer für das Korrekturlesen dieses Manuskripts. Ich danke ihm für die Mühe und das Interesse sich durch eine vollkommen fremde Thematik zu kämpfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Thorsten Bosker der mich stets bedingungslos unterstützt hat und mir immer hilfreich zur Seite stand. Ich danke ihm sehr für seine unendliche Geduld mit mir während meiner Doktorarbeit und dafür, dass er einfach immer für mich da ist.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe als die angegebenen.

Düsseldorf, den

---

Katrin Spekker