

Virulenz-assoziierte Proteine von *Toxoplasma gondii*:

Identifikation und funktionelle Charakterisierung

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Martin Gastens

aus Geldern

Düsseldorf

2003

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

Referent: Prof. Dr. Hans-Georg Fischer

Koreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2003

Teile der Arbeit wurden in folgenden Artikeln und Tagungsbeiträgen veröffentlicht:

Nischik, N., Schade, B., Gastens, M. H., Dytnerka K., Dlugonska, H, Reichmann, G., and Fischer, H. G. 2000. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with downregulation of interleukin-12 inducing activity and reduced biosynthesis of dense granule proteins and actin. *Immunobiology*. 203: 331.

Nischik, N., Dytnerka K., Gastens, M. H., Reichmann, G., Hoffmann, R., and Fischer, H. G. 2001. Identification of virulence-associated *T. gondii* proteins by differential proteome analysis. International Congress on Toxoplasmosis, Freising.

Gastens, M. H. and Fischer, H. G. 2002. Proteomic identification and molecular characterisation of *Toxoplasma gondii* eukaryotic translation initiation factor 4A, differentially expressed in tachyzoites and bradyzoites. DGP Joint annual meeting for parasitology, Lübeck.

Gastens, M. H. and Fischer, H. G. 2002. *Toxoplasma gondii* eukaryotic translation initiation factor 4A associated with tachyzoite virulence is down-regulated in the bradyzoite stage. *Int. J. Parasitol.* 32: 1225.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft über Projekt Re 1334/2-1 und über den SFB 194 „Strukturveränderung und Dysfunktion im Nervensystem“ Projekt B11.

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Biologie von <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.1.1 Entwicklungszyklus und Wirtswechsel	2
1.1.2 Stadien im Zwischenwirt	4
1.1.3 Invasion in die Wirtszelle und intrazelluläre Entwicklung	7
1.2 <i>T. gondii</i> Infektion des Wirtsorganismus	10
1.2.1 Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i>	11
1.2.2 Virulenz von <i>T. gondii</i> in der Maus	14
1.3 Fragestellung und Ziele der Arbeit	17
2 Ergebnisse	18
2.1 Identifizierung putativer Virulenzfaktoren von <i>Toxoplasma gondii</i>	18
2.1.1 Langzeit-Kultivierung reduziert die Maus-Virulenz des <i>T. gondii</i> - Isolats BK	18
2.1.2 Im Proteom attenuierter BK-Tachyzoiten ist der Gehalt distinkter Proteine reduziert	19
2.1.2.1 Stark reduzierte Expression des p53 in attenuierten BK	20
2.1.2.2 Identifizierung des p53 als eIF4A	21
2.1.2.3 Verifikation der differentiellen Expression von eIF4A	22
2.1.2.4 Zwei weitere Proteine der Translation sind in aBK-Tachyzoiten geringer exprimiert als in vBK-Tachyzoiten	23
2.1.3 Proteomanalyse der <i>T. gondii</i> Stämme S22 und S23	24
2.2 Charakterisierung des eIF4A (p53) von <i>T. gondii</i>	26
2.2.1 Expression und subzelluläre Verteilung von eIF4A	26
2.2.2 Stadienspezifische Expression	28
2.2.2.1 eIF4A-Proteinexpression ist in Bradyzoiten reduziert	28
2.2.2.2 Die stadienspezifische Expression von eIF4A wird auf Transkriptionsebene reguliert	29
2.3 Einfluss von eIF4A auf die <i>T. gondii</i> Infektion der Maus	30
2.3.1 Untersuchungen von eIF4A als natürliches Antigen	31
2.3.1.1 Rekombinante Expression von eIF4A in <i>E. coli</i>	31
2.3.1.2 <i>T. gondii</i> eIF4A ist kein natürliches Antigen	32
2.3.2 Überexpression von eIF4A in attenuierten Toxoplasmen	33

2.3.2.1	Transiente Expression von eIF4A+Myc und LDH1+Myc in aBK-Toxoplasmen	34
2.3.2.2	Expressionsanalyse der Klone aBK ^{eIF4A+Myc} und aBK ^{LDH1+Myc}	35
2.3.3	eIF4A Überexpression erhöht die Virulenz von aBK in Mäusen	37
2.3.4	<i>In vitro</i> ist die Proliferation aller aBK-Mutanten vergleichbar	39
2.3.5	Die Infektion der Maus mit aBK ^{eIF4A+Myc} - und aBK ^{LDH1+Myc} -Toxoplasmen	40
2.3.5.1	IL12- und IFN γ -Serumwerte steigen während der Infektion an	40
2.3.5.2	Erhöhte aBK ^{eIF4A+Myc} -Parasitenlast in der Bauchhöhle	42
2.3.5.3	Die intraperitoneale Zytokinproduktion ist bei aBK ^{eIF4A+Myc} - und aBK ^{LDH1+Myc} -infizierten Mäusen vergleichbar	43
2.3.6	GRA7 wird in aBK ^{eIF4A+Myc} -Toxoplasmen verstärkt exprimiert.....	45
2.4	Generierung und Charakterisierung einer <i>GRA7</i> -defizienten <i>T. gondii</i> -Mutante.....	47
2.4.1	Konstruktion einer <i>GRA7</i> ‚knock out‘ Mutante im Stamm RH durch homologe Rekombination	47
2.4.2	Die Δ <i>GRA7</i> -Mutante zeigt keine <i>GRA7</i> -Expression	49
2.4.3	Proliferation der Δ <i>GRA7</i> -Mutante <i>in vitro</i>	51
2.4.4	Die Virulenz der Δ <i>GRA7</i> -Mutante ist unverändert zum Wildtyp	52
3	Diskussion	54
3.1	Identifizierung Virulenz-assoziiertes mikrobieller Proteine	54
3.2	eIF4A, ein neuer Virulenzfaktor von <i>T. gondii</i>	57
3.2.1	eIF4A ist ein stadienabhängig exprimierter Translationsinitiationsfaktor in <i>T. gondii</i>	57
3.2.2	Mögliche Wirkmechanismen des überexprimierten eIF4A.....	59
3.2.3	Die Infektion der Maus mit aBK ^{eIF4A+Myc} -Toxoplasmen.....	63
3.3	<i>GRA7</i> ist kein Virulenzfaktor sondern die Stärke seiner Expression ist ein Indikator für <i>T. gondii</i> -Virulenz.....	66
4	Material	70
4.1	Allgemeines	70
4.2	Plasmide	70
4.3	Proteine	70
4.3.1	Antikörper	70

4.3.2	Zytokine	71
4.3.3	Restriktionsenzyme	71
4.3.4	Sonstige Enzyme	71
4.4	Nukleinsäuren, Desoxyoligonukleotide und Nukleotide	72
4.5	Medien und Puffer	74
4.6	Feinchemikalien	74
4.7	Sonstige Materialien und Geräte	77
4.8	Organismen	77
4.8.1	Mausstämme	77
4.8.2	Zelllinien	78
4.8.3	<i>Toxoplasma gondii</i> Stämme	78
4.8.4	Bakterien	78
5	Methoden	79
5.1	Mäuse	79
5.1.1	Serumgewinnung	79
5.1.2	Präparation von Peritoneal-Exsudatzellen	79
5.1.3	Zytospins	80
5.1.4	Virulenzanalyse	80
5.2	Zellkulturmethoden	80
5.3	Kultivierung und Sicherung von Zelllinien	81
5.3.1	L929 Fibroblasten	81
5.3.2	HS27 Fibroblasten	81
5.4	Toxoplasmen	81
5.4.1	<i>In vitro</i> Kultivierung und Sicherung	81
5.4.2	Gewinnung von Hirnzysten	82
5.4.3	Toxoplasmen-Proliferationstest	82
5.4.4	Plaque-Assay	83
5.5	Mikrobiologische Methoden	84
5.5.1	Haltung und Sicherung von Bakterienstämmen	84
5.5.2	Anzucht von ü.N.-Kulturen	84
5.5.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	85
5.5.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	85
5.6	Molekularbiologische Methoden	86
5.6.1	UV/VIS-Spektroskopie	86

5.6.1.1	Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	86
5.6.1.2	Streumessung	86
5.6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	87
5.6.3	Aufreinigung von DNA	87
5.6.3.1	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	87
5.6.3.2	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	88
5.6.4	Enzymatische Reaktionen	88
5.6.4.1	Restriktionshydrolysen.....	88
5.6.4.2	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden.....	88
5.6.4.3	Klenow-Reaktion zum Auffüllen von überhängenden 5'-DNA Enden.....	89
5.6.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten	89
5.6.4.5	cDNA-Synthese	89
5.6.4.6	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	90
5.6.4.7	DNA-Sequenzierungen.....	90
5.6.5	Isolation von Nukleinsäuren.....	90
5.6.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	90
5.6.5.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	91
5.6.5.3	Isolierung von genomischer DNA	91
5.6.5.4	Isolierung von Gesamt-RNA.....	91
5.6.6	Rekombinante Expression von <i>T. gondii</i> eIF4A in <i>E. coli</i>	93
5.6.7	Isolation genomischer <i>GRA7</i> -Sequenzen von <i>T. gondii</i> 'Genome walking'	94
5.6.8	Southernblot zur Identifikation von <i>GRA7</i> 'knock out' Mutanten	94
5.6.9	Gelelektrophoresen	95
5.6.9.1	Agarosegelelektrophorese.....	95
5.6.9.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	96
5.6.9.3	Zweidimensionale Proteinauftrennung	97
5.7	Proteinanalysen.....	99
5.7.1	Präparation von Toxoplasma-Lysat	99
5.7.2	Zellfraktionierung und Triton X-114 Partitionierung	99
5.7.3	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen	100
5.7.3.1	Coomassie-Färbung von Proteinen	100

5.7.3.2	Zink-Imidazol Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	101
5.7.3.3	Elektrotransfer von Proteinen für den Immunonachweis (Western Blot).....	102
5.7.3.4	Immunonachweis von Proteinen.....	102
5.7.4	„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)	103
5.7.5	Quantitativer Proteomvergleich	104
5.7.6	Identifizierung einzelner Proteine im 2D-Gel	104
5.7.7	Immunfluoreszenzanalysen	105
5.8	Erzeugung von <i>Toxoplasma gondii</i> -Mutanten	106
5.8.1	Überexpression von Proteinen in <i>T. gondii</i>	106
5.8.2	Zielvektor für den <i>GRA7</i> „knock out“ mit homologer Rekombination	106
5.8.3	Transfektion von <i>Toxoplasma gondii</i>	107
5.8.4	Isolierung stabiler <i>T. gondii</i> -Transfektanten	108
6	Literaturverzeichnis.....	109
7	Anhang	122
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	122
7.2	Danksagung	125
7.3	Eidesstattliche Erklärung	126

Zusammenfassung

Bislang sind erst wenige Faktoren molekular bekannt, die die Virulenz des intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* bestimmen. Ziel der Arbeit war es, Proteine zu identifizieren, deren Expression in genetisch verwandten aber unterschiedlich virulenten Toxoplasmen mit der Virulenz in der Maus korreliert. Die Bedeutung solcher Proteine für die Virulenz wurde durch genetische Manipulation geprüft.

Die Proteome je eines virulenten und avirulenten *T. gondii* Hybridstammes sowie eines virulenten Isolats und einer attenuierten Variante wurden verglichen. Mehrere Proteinspots wurden identifiziert, deren Volumen im Proteom avirulenter Toxoplasmen reduziert ist. Unter anderem wurde p53, das *T. gondii* Homolog des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors (eIF)4A, als neuer putativer Virulenzfaktor identifiziert und mit dem ‚dense granule‘ Protein (GRA)7 ein bekannter bestätigt. eIF4A ist in *T. gondii* stadienabhängig exprimiert. Im Tachyzoiten liegt das Protein zytoplasmatisch vor, dagegen waren im Bradyzoiten Protein und Transkript kaum nachweisbar. Vom Immunsystem der Maus wird eIF4A nicht als Antigen erkannt.

Um eine Beteiligung des eIF4A an der Virulenz zu prüfen, wurde eine eIF4A-überexprimierende Mutante des attenuierten Stammes generiert. Obwohl sich die intrazelluläre Replikationsrate der Mutante und des Ausgangsstammes *in vitro* nicht unterscheiden, ist die Mutante deutlich virulenter in der Maus. Diese Zunahme der Virulenz korreliert nicht, wie für andere *T. gondii*-Isolate gezeigt, mit einer übersteigerten Zytokinproduktion von Immunzellen. Die erhöhte Virulenz geht vielmehr einher mit einer unkontrollierten Proliferation von Tachyzoiten am Ort der Infektion, was auf einen neuen Virulenzmechanismus hinweist. Wie andere virulente Isolate zeigte die eIF4A-überexprimierende Mutante eine, verglichen mit avirulenten Toxoplasmen, erhöhte ‚steady-state‘ Synthese von GRA7. Die Deletion des GRA7 Gens in virulenten Toxoplasmen reduzierte jedoch nicht deren Virulenz in der Maus. GRA7 scheint in den untersuchten *T. gondii* Stämmen somit kein echter Virulenzfaktor, sondern eher Indikator der Virulenz zu sein.

In dieser Arbeit wurde mit eIF4A erstmalig ein Virulenzfaktor von *T. gondii* mittels Überexpression in attenuierten Toxoplasmen identifiziert. Als Initiationsfaktor der Translation spielt eIF4A vermutlich eine Rolle bei der Expression weiterer Virulenzvermittelnder Gene, zu denen *GRA7* nicht zählt.

1 Einleitung

1.1 Biologie von *Toxoplasma gondii*

Das obligat intrazellulär parasitierende Protozoon *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) wurde 1908 aus dem nordafrikanischen Nager *Ctenodactylus gundi* isoliert (Nicolle und Manceaux, 1908). *T. gondii* ist ein außergewöhnlich erfolgreicher Parasit, der nahezu alle warmblütigen Organismen als Wirte befällt.

1.1.1 Entwicklungszyklus und Wirtswechsel

Taxonomisch wird *T. gondii* dem Stamm Apicomplexa und darin der Klasse Coccidia und der Familie Sarcocystidae zugeordnet (Mehlhorn und Walldorf, 1988). Die Mitglieder der Klasse Coccidia durchlaufen einen dreiphasigen Lebenszyklus (Abb. 1.1). Nach oraler Aufnahme von Gewebezysten durch einen Wirt dringt der haploide Parasit in dessen Darmzellen ein und durchläuft mehrere asexuelle Teilungsschritte (Dubey, 1998). Im Darm von Katzen, dem Endwirt, bilden sich Mikro- und Makrogametozyten aus, die zu einer Zygote bzw. Oozyste fusionieren. Die Oozyste, das einzige diploide Stadium von *T. gondii*, bildet eine feste Zystenwand aus und wird mit den Faeces ausgeschieden. Im Freien entsteht durch Sporulation und meiotischer Reduktionsteilung nach ein bis fünf Tagen aus der Oozyste ein Oktett von Sporozoiten. Die Sporozoiten sind hochinfektiös und können jahrelang überdauern (Frenkel, 1973).

In allen anderen Wirten außer der Katze, den so genannten Zwischenwirten, vermehrt sich *T. gondii* nur asexuell durch Teilung. Nach oraler Aufnahme von Sporozysten durch einen Zwischenwirt wie z.B. der Maus, differenzieren die Sporozoiten zu sich schnell teilenden Tachyzoiten, die die akute Infektion auslösen. Während dieser Phase ist eine vertikale Transmission auf sich entwickelnde Föten möglich. In den meisten Zwischenwirten entwickelt sich nach der akuten Phase eine chronische Phase der Infektion. Dabei differenziert der Parasit vom Tachyzoiten- zum Bradyzoitenstadium. Im Bradyzoitenstadium kann der Parasit lebenslang in Gewebezysten persistieren. Die Aufnahme von Gewebezysten durch Allesfresser

oder Fleischfresser führt nur bei Katzen zum sexuellen Vermehrungszyklus, während in Zwischenwirten eine asexuelle Vermehrung erfolgt.

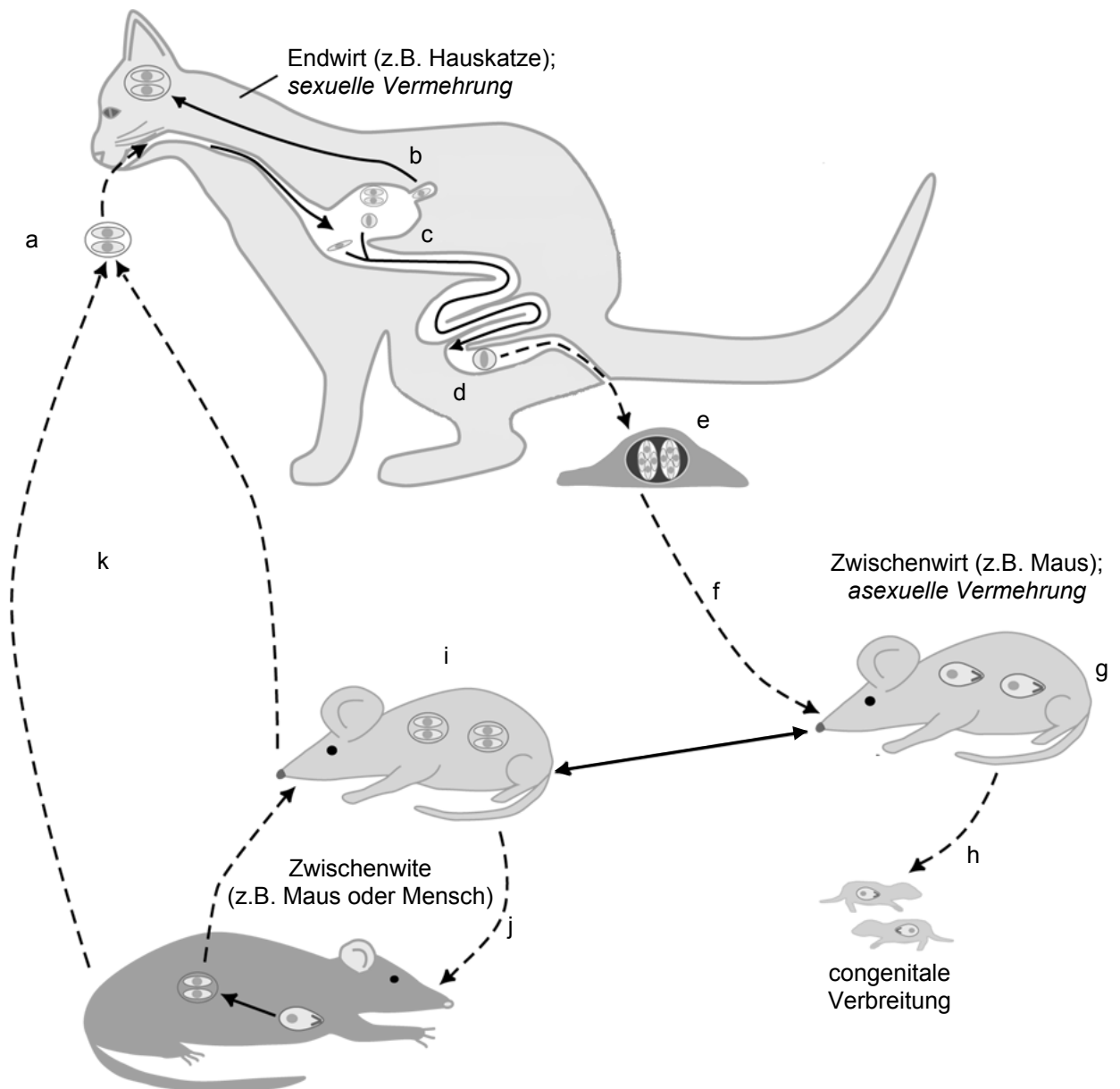


Abb. 1.1: Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*. Die sexuelle Vermehrungsphase findet ausschließlich in Katzen (*Felidae*) statt. Aus aufgenommenen Gewebezysten werden Bradyzoiten frei (a) und diese differenzieren nach mehreren Teilungen im Darm (b) zu Mikro- und Makrogametozyten (c). Ein Mikro- und ein Makrogametozyt fusionieren zur Oozyste (Zygote) (d). Nach Freisetzung und Meiose (e) bilden sich aus der Oozyste infektiöse Sporozysten, die bei Aufnahme (f) durch den Zwischenwirt zuerst zu Tachyzoiten (g) und in der chronischen Phase der Infektion zu Bradyzoiten (i) differenzieren. Enzystierte Bradyzoiten werden vom Zwischen- (j) bzw. Endwirt (k) bei Fleischverzehr aufgenommen. Im Zwischenwirt können auch Föten kongenital durch Tachyzoiten infiziert werden (h). Gestrichelte Linien stellen Verbreitungswege, durchgezogene Linien Differenzierungsschritte dar (verändert nach Ajioka *et al.*, 2001).

In der Katze ist prinzipiell eine Kreuzung von unterschiedlichen *T. gondii*-Isolaten möglich (Sibley *et al.*, 1992). Es kommen jedoch in der Natur nur sehr selten Kreuzungen von Toxoplasmen vor, da der Endwirt simultan mit zwei verschiedenen Isolaten infiziert sein muss, so dass während der sexuellen Vermehrungsphase eine Paarung von Makro- und Mikrogameten beider Isolate stattfinden kann. Aus experimentellen Kreuzungen ist allerdings bekannt, dass in Katzen, die simultan mit zwei Isolaten infiziert werden, sowohl rekombinante Sporozoiten als auch Nachkommen aus der Selbstbefruchtung von Gameten eines Stammes ausgebildet werden (Su *et al.*, 2003).

1.1.2 Stadien im Zwischenwirt

Im Zwischenwirt lassen sich während der frühen Phase der Infektion mit *T. gondii* primär schnell wachsende Tachyzoiten nachweisen. Erst in der chronischen Phase der Infektion konvertieren die Parasiten zum langsam wachsenden Bradyzoitenstadium. Beide Stadien weisen die für Toxoplasmen charakteristische gebogene Form auf (*toxon* griech. Bogen, *plasma* griech. Form) und sind mit einer Länge von ca. 6 µm und einer Breite von ca. 2 µm ungefähr gleich groß (Weiss und Kim, 2000). Extrazelluläre Tachyzoiten und Bradyzoiten sind in ihrer Morphologie lichtmikroskopisch nicht zu unterscheiden. Beide Stadien sind jedoch ultrastrukturell durch verschiedene Organellen gekennzeichnet, die sich elektronenmikroskopisch identifizieren lassen. Toxoplasmen besitzen die klassischen Organellen einer eukaryontischen Zelle wie den Zellkern, Mitochondrien, Golgiapparat und endoplasmatisches Retikulum. Der Apicoplast ist ein Plastid-ähnliches Organell, das von vier Membranen umgeben wird und ein zirkuläres DNA-Molekül von 35 kb enthält. Darüber hinaus weisen charakteristische Strukturen und Organellen Toxoplasmen als Mitglied der Apicomplexa aus: Den Parasit umgibt eine aus drei Membranen bestehende Pellikula. Beide inneren Membranen enden am vorderen bzw. hinteren Ende in polaren Ringen. An beiden Polringen setzen Mikrotubuli an, die subpellikulär durch den ganzen Parasiten vom apikalen bis zum posterioren Ende verlaufen und vermutlich für die Motilität essentiell sind (Morrissette und Sibley, 2002). Der Apikalkomplex, der das taxonomische Kriterium für die Zuordnung von *T. gondii* zum Stamm der Apicomplexa liefert, liegt am apikalen Ende des Parasiten. Als

charakteristische Strukturen finden sich im Apikalkomplex von *T. gondii* das Conoid und die sekretorischen Organellen Rhoptrien und Micronemen.

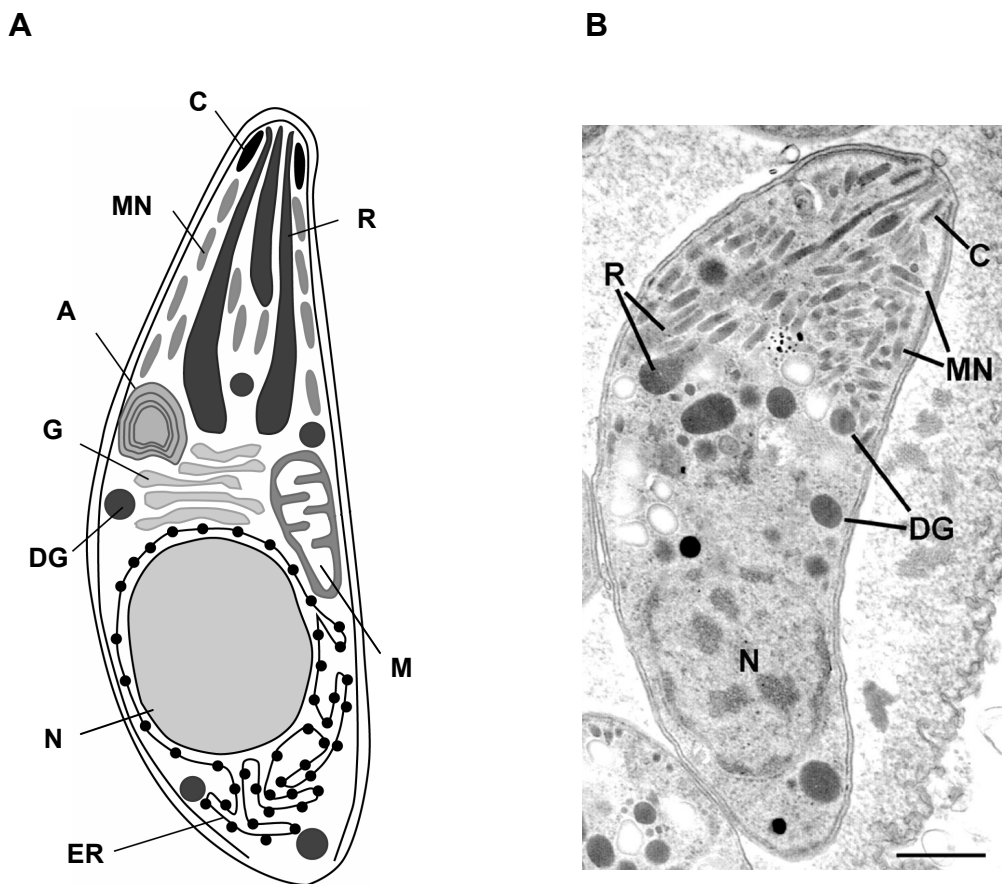


Abb. 1.2: Ultrastruktur eines Tachyzoiten. (A) Schematische Darstellung (verändert nach Ajioka *et al.*, 2001). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme (mit freundlicher Genehmigung Dr. J. Wastling). ER: endoplasmatisches Retikulum, N: Nukleus, DG: ‚dense granule‘, G: Golgi, A: Apicoplast, MN: Micronemen, C: Conoid, R: Rhoptrien, M: Mitochondrien, Markierungsbalken: 1 μm .

Das Conoid, ein stumpfer hohler Kegel, wird von den Polarringen umgeben und kann während der Invasion in die Wirtszelle vor und zurück geschoben werden sowie kreisende Bewegungen ausführen. Damit spielt das Conoid wahrscheinlich eine Rolle bei der Penetration der Wirtszelle während der Invasion in die Zelle (Morrisette und Sibley, 2002). Die Rhoptrien (*rho* griech. keulenförmig) sind flaschenförmige sekretorische Organellen, die vom apikalen Ende bis zum Golgiapparat verlaufen. Ebenfalls am anterioren Ende des Parasiten liegen die sekretorisch aktiven Micronemen, die im Vergleich zu Rhoptrien aus kleinen mikrovesikulären Röhren bestehen. Die dritte Klasse von exkretorischen Organellen

stellen die ‚dense granules‘ dar, elektronendichte Granula, die im gesamten Parasiten verteilt liegen (Carruthers, 1999).

Im Unterschied zu diesen ultrastrukturellen Charakteristika, die für beide Stadien im Zwischenwirt gleich sind, ist der Zellkern des Bradyzoiten weiter zum posterioren Ende verlagert. Die Struktur der Rhoptrien ist im Bradyzoiten fest und elektronendicht, während die Rhoptrien im Tachyzoiten eine honigwabenartige Struktur aufweisen. Bradyzoiten enthalten im Gegensatz zu Tachyzoiten mehrere Amylopektin-Granula, die sich elektronenmikroskopisch als helle Flecken abbilden. Die Amylopektin-Granula spielen vermutlich eine Rolle bei der Energieversorgung der Bradyzoiten (Weiss und Kim, 2000). In einer 50 bis 70 µm großen Gewebezyste befinden sich etwa 500 bis 2000 Bradyzoiten, die von einer Zystenwand umgeben sind. Die 5 µm dünne, elastische Zystenwand besteht aus Proteinkomponenten, Lektinen und Chitin (Weiss und Kim, 2000). Nach oraler Aufnahme von Gewebezysten wird die Zystenwand im Verdauungstrakt des Wirts durch Pepsin und Trypsin aufgelöst. Dabei werden Bradyzoiten frei, die im Gegensatz zu Tachyzoiten relativ resistent gegen Peptidasen sind (Weiss und Kim, 2000).

Mittels Antikörper und T-Zellen wurden stadienspezifisch exprimierte Proteine identifiziert. Die Proteine ‚surface antigen‘ (SAG)1 und SAG2 sind tachyzoitenspezifisch und finden sich auf der Oberfläche der Parasiten (Burg *et al.*, 1988; Mineo *et al.*, 1993). Das Rhoptrienprotein (ROP)9 (Reichmann *et al.*, 2002) ist ein sekretiertes Molekül der Rhoptrien und ebenfalls nur in Tachyzoiten nachgewiesen. ROP9 wurde mit Hilfe eines T-Zellklons und SAG1 und SAG2 mit monoklonalen Antikörpern (mAk) identifiziert. Mit mAk wurden auch eine ganze Reihe von bradyzoitenspezifischen Proteinen definiert. Dazu zählen das ‚bradyzoite antigen‘ (BAG)1, das zytoplasmatisch in Bradyzoiten lokalisiert ist, und die Proteine p34 und SAG4, die auf der Oberfläche von Bradyzoiten exprimiert sind (Tomavo *et al.*, 1991; Bohne *et al.*, 1995). Das ‚matrix antigen‘ (MAG)1 und das Zystenwandprotein CST1 sind nur in der Zyste von Bradyzoiten exprimiert (Parmley *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1992).

Die Differenzierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten *in vitro* oder im Zwischenwirt wird allgemein als Reaktion auf einen Stresszustand angesehen (Weiss und Kim, 2000). In Übereinstimmung damit exprimieren nur Bradyzoiten BAG1, das homolog zu kleinen Hitzeschockproteinen (HSP) von Pflanzen ist. Auch HSP70 wird in Bradyzoiten verstärkt exprimiert (Weiss *et al.*, 1998). In der Maus geht die Induktion

der Stadienkonversion mit der einsetzenden Immunantwort auf die Infektion einher. Wahrscheinlich induziert dieser „Immundruck“ die Differenzierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten, während bei der Reaktivierung einer chronischen Infektion, wie sie bei Immunsuppression auftritt, umgekehrt Bradyzoiten zu Tachyzoiten konvertieren (Gross *et al.*, 1996). *In vitro* lassen sich Tachyzoiten durch verschiedene Stressfaktoren, wie z.B. Kultivierung bei erhöhter Temperatur, Anhebung des pH-Werts im Medium oder Zugabe von Natriumarsenit, zu Bradyzoiten differenzieren (Soete und Dubremetz, 1996). Auch hier erfolgt die umgekehrte Entwicklung von Bradyzoiten zu Tachyzoiten nach dem Entfernen der Stress auslösenden Faktoren.

Primäre Auswirkungen der Stadienkonversion sind neben den Veränderungen der ultrastrukturellen Morphologie und der Induktion von Markermolekülen in beiden Stadien auch die grundlegende Veränderung des Metabolismus. Dazu zählt einerseits die deutlich reduzierte Wachstumsrate von Bradyzoiten als auch die Umstellung des Energiestoffwechsels (Jerome *et al.*, 1998). Im Bradyzoiten findet kein Zitratzyklus statt, und ebenso fehlt eine funktionelle Atmungskette (Denton *et al.*, 1996). In diesem Stadium gewinnt der Parasit die benötigte Energie wahrscheinlich primär aus der Umsetzung von Amylopektin zu Laktat (Weiss und Kim, 2000). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stadienkonversion zwischen Bradyzoiten und Tachyzoiten durch Stressfaktoren vermittelt zu sein scheint, die die Expression eines breiten Spektrums von stadienspezifischen Genprodukten induzieren. Diese Adaption an neue Lebensbedingungen verändert tief greifend den Metabolismus und die Feinstruktur des Parasiten.

1.1.3 Invasion in die Wirtszelle und intrazelluläre Entwicklung

T. gondii kann sich nur intrazellulär replizieren, und somit ist es von fundamentaler Bedeutung für den Parasiten effizient, in Wirtszellen einzudringen. Die Invasion von *T. gondii*-Parasiten in die Wirtszelle ist ein aktiver Prozess, dessen mechanischen Vorgänge recht gut untersucht sind und der in nur 15 Sekunden abläuft (Smith, 1995). Der erste wichtige Schritt dabei ist die Adhäsion des Parasiten an die Wirtszelle. Als einziges Mitglied des Stamms der Apicomplexa kann *Toxoplasma gondii* alle kernhaltigen Zellen von Vertebraten und Insekten infizieren (Joiner und

Dubremetz, 1993). Der Parasit kann ein solch breites Spektrum von verschiedenen Wirtszellen befallen, weil die primäre Bindung an hochkonservierte Strukturen erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass der Parasit das extrazelluläre Matrixprotein Laminin der Wirtszellen bindet. Tachyzoiten, die mit Wirtszelllaminin dekoriert sind, können an den $\alpha 6 \beta 1$ Lamininrezeptor humaner Fibroblasten und ‚chinese hamster ovary‘ (CHO) Zellen adhären (Furtado *et al.*, 1992). Weiterhin ist beschrieben, dass das Oberflächenmolekül SAG1 an Neoglykoproteine binden kann, und dass diese Bindung die Adhäsion an die Wirtszelle vermittelt (Mineo *et al.*, 1993).

Auf diese erste Phase einer ungerichteten Adhäsion folgt eine Reorientierung des Tachyzoiten, so dass Apikalkomplex und Wirtszellmembran einander direkt gegenüber liegen. Diese Umorientierung wird vermutlich durch Micronemenproteine (MIC) gesteuert, die Calcium-abhängig während der Ausrichtungsphase vom apikalen Ende des Parasiten sezerniert werden (Lovett *et al.*, 2002). Gut charakterisiert ist MIC2. Es bindet sowohl Laminin als auch Glykosaminoglykane, die ein Teil von Heparinsulfatglykanrezeptoren sind. Damit wird MIC2 als entscheidender Faktor angesehen, der eine breite Wirtsspezifität vermittelt und der essentiell für den Parasiten ist (Carruthers, 1999). Neben MIC2 sind auch MIC1, MIC3 und MIC4 als Adhäsine beschrieben, die wahrscheinlich zur Ausbildung der so genannten ‚tight junction‘ zwischen Parasit und Wirtszelle führen. In dieser Zone sind die Zytoskelettstrukturen von Wirt und Parasit eng miteinander verbunden und dort wird die Zellmembran der Wirtszelle zur Invasion durchbrochen (Soldati *et al.*, 2001).

Kurz vor dem Eintritt des Parasiten in die Wirtszelle wird aus den Rhoptrien ein Gemisch der organellspezifischen Proteine ROP1 bis ROP9 und unbekannter Membrankomponenten in die Wirtszelle sezerniert. In Folge dessen stülpt der Parasit an der Kontaktzone die Wirtszellmembran ins Wirtszellzytoplasma ein und es entsteht beiderseits die so genannte ‚moving junction‘, eine Kontaktzone rund um den Parasiten zwischen Wirtszell- und Tachyzoitenmembran, die vom apikalen zum posterioren Ende des eindringenden Parasiten wandert (Pfefferkorn, 1990). Nach Abschluss dieses Prozesses schließt sich die Wirtszellmembran wieder und es wird die so genannte parasitophore Vakuole (PV) als ein neues intrazelluläres Kompartiment in der Wirtszelle gebildet. Die Membran der PV besteht zu 85% aus der eingestülpten Wirtszellmembran. Aus dieser werden Transmembran- und membranassoziierte Proteine sehr schnell entfernt und unter anderem durch

Rhoprienproteine ersetzt (Joiner und Roos, 2002). Die Modifikation der PV-Membran durch *T. gondii* verhindert, dass die Vakuole mit endozytotischen Kompartimenten des Wirts fusioniert und ihr Inhalt in Lysosomen degradiert wird (Hakansson *et al.*, 2001). Damit stellt die PV ein sicheres Kompartiment dar, in dem der Parasit seine intrazelluläre Replikation durchführen kann. Im Laufe der intrazellulären Toxoplasmenentwicklung reift die PV zu einem spezialisierten Kompartiment heran, das die Aufnahme von Nährstoffen und den Metabolitenaustausch zwischen Parasit und Wirt gewährleistet. Übereinstimmend mit dieser Annahme finden sich in direkter Nähe sowohl endoplasmatisches Retikulum der Wirtszelle als auch Wirtzell-Mitochondrien, deren Assoziation vermutlich durch ROP Proteine in der PV induziert wird (Hakansson *et al.*, 2001). Neben diesen Proteinen enthält die PV porenartige Strukturen, die den Durchtritt von Molekülen bis maximal 1300 Da erlauben (Schwab *et al.*, 1994).

Um die parasitophore Vakuole zu stabilisieren, bildet sich nach der Invasion von *T. gondii* innerhalb von 10 bis 20 Minuten am posterioren Ende des Tachyzoiten ein tubulovesikuläres Netzwerk (Mercier *et al.*, 2002). Dieses Netzwerk breitet sich dann durch den ganzen vakuolären Raum aus und bildet längliche Tubuli mit einem Durchmesser von 60 bis 90 nm, die mit der Membran der PV in Verbindung stehen (Mercier *et al.*, 1998). Das intravakuoläre Netzwerk ist mit ‚dense granule‘ Proteinen (GRA) ausgekleidet, die nach erfolgter Invasion in die parasitophore Vakuole sekretiert werden. Keinem der bisher beschriebenen GRA-Proteine GRA1 bis GRA8 konnte bisher eine Funktion zugeordnet werden (Carruthers, 1999), wobei neuste Arbeiten auf eine Beteiligung von GRA2 und GRA6 bei der Ausbildung des tubulovesikulären Netzwerks hindeuten (Mercier *et al.*, 2002). GRA-Proteine werden in löslicher Form primär am posterioren Ende von *T. gondii* in das Lumen der PV sezerniert (Sibley *et al.*, 1995). Alle GRA-Proteine, mit Ausnahme von GRA1, sind danach nicht mehr löslich und entweder mit dem intravakuolären Netzwerk oder der parasitophoren Membran oder mit beiden Strukturen assoziiert (Carruthers, 1999).

Alle Apicomplexa führen asexuelle Zellteilungen durch, bei denen die Tochterzellen in der Mutterzelle entstehen. Es werden prinzipiell zwei verschiedene Teilungsmechanismen unterschieden: Bei der Endodyogenie entstehen aus einer Mutterzelle zwei Parasiten, während bei der Schizogonie mehrere bis viele Parasiten

aus einer Mutterzelle entstehen können. Für *T. gondii* ist seit langer Zeit bekannt, dass der Parasit sich durch Endodyogenie repliziert. Die bei Toxoplasma beobachtete Endodyogenie entspricht quasi dem letzten Zyklus der Kernreplikation und Zellteilung der Schizogonie (Sheffield und Melton, 1968). Die Generierung eines weiteren Apikalkomplexes im Mutterzellzytoplasma kündigt die bevorstehende Teilung des Tachyzoiten an. Die Position dieser Strukturen ist in sich teilenden Parasiten typischerweise anterior und nahe zur Kernhülle (Sheffield und Melton, 1968). Bei der weiteren Ausbildung der Tochterzellen bildet sich eine U-förmige innere Membran, die sich posterior fortsetzt und die Hälfte der Mutterzellorganellen umschließt. Danach bilden sich zwei neue Kerne, die von den Mikrotubuli des Spindelapparats in jede Tochterzelle transportiert werden. Der innere Membrankomplex weitet sich parallel zur Entwicklung der Tochterzellen aus und verteilt das Mutterzytoplasma zwischen den Tochterzellen. Damit ist die Teilung abgeschlossen.

1.2 *T. gondii* Infektion des Wirtsorganismus

Die chronische Infektion mit *T. gondii* ist eine der am meisten verbreiteten Infektionskrankheiten des Menschen, 20 bis 90% aller Erwachsenen sind mit *T. gondii* infiziert (Sibley *et al.*, 1999). Während der akuten Phase der Infektion proliferieren Tachyzoiten in kernhaltigen Zellen des Wirts und verbreiten sich über eine ganze Reihe von Organen (Zenner *et al.*, 1998). Nach der akuten Phase konvertiert der Parasit zum Bradyzoitenstadium und bildet während der sich anschließenden chronischen Phase der Infektion Zysten in verschiedenen Organen, besonders im Gehirn, Herz und in Skelettmuskeln (Derouin und Garin, 1991). Die Infektion von immunkompetenten Personen verläuft üblicherweise unbeachtet und symptomlos. Eine Immunsuppression von chronisch infizierten Menschen, wie sie bei AIDS-Infizierten oder nach Transplantationen auftritt, kann zur Reaktivierung einer latenten Infektion führen und ist durch den Aufbruch von Gewebezysten und einer Proliferation von Tachyzoiten gekennzeichnet (Weiss und Kim, 2000). Mit der Maus gibt es ein exzellentes Tiermodell sowohl für die akute als auch für die chronische Infektion durch *T. gondii*. Die Resistenz von Mäusen gegen die chronische Infektion ist genetisch festgelegt. Nach experimenteller Infektion entwickeln resistente

Mausstämme, wie z.B. der Stamm BALB/c, eine chronische-latente Toxoplasmose, die wie im Menschen lebenslang besteht. Im Gegensatz dazu entwickeln susceptible Mausstämme, wie z.B. der Stamm C57BL/6 während der späten Phase der Infektion eine nekrotisierende Toxoplasma-Enzephalitis im Hirn, an der die Tiere sterben (Suzuki, 2002).

1.2.1 Immunabwehr gegen *T. gondii*

Nach der Infektion mit *T. gondii* induzieren das angeborene und adaptive Immunsystem eine integrierte Immunantwort, die zur Resistenz gegen diesen Parasit führt. Die angeborene Immunität hält Mechanismen bereit, die einen anfänglichen Schutz gegen die akute Phase der Infektion bieten. Die Entwicklung einer zellulären adaptiven Immunantwort ist wichtig für den dauerhaften Schutz des infizierten Individuums (Lieberman und Hunter, 2002).

Wie auch bei anderen parasitären Infektionen ist sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität gegen *T. gondii* vorwiegend zellvermittelt. Obwohl ein breites Spektrum an anti-*T. gondii* Antikörpern gebildet wird, spielt die humorale Immunantwort eine untergeordnete Rolle. In der Mukosa des Darms können Antikörper-vermittelte Abwehrmechanismen die Verbreitung des Parasiten verlangsamen (Chardes und Bout, 1993). Jedoch fielen Mäuse, die keine T-Zellen ausbilden können, auch nach der Gabe von anti-*T. gondii* Antikörpern der Infektion zum Opfer (Lindberg und Frenkel, 1977). Im Gegensatz dazu konnte durch Transplantation von Lymphknoten- oder Milzzellen spezifisch eine Immunität gegen den Parasiten übertragen werden (Frenkel, 1967).

Viele verschiedene Zelltypen sind in die zelluläre Immunantwort eingebunden. Die Zellen lassen sich grob als Empfänger oder Sender von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon (IFN) γ und Interleukin (IL)12 einteilen. IL12 ist der induzierende Faktor der IFN γ Expression und IFN γ ist ein absolut essentielles Zytokin bei der Bekämpfung der *T. gondii* Infektion, da es antiparasitäre Effektormechanismen in einer Vielzahl von Zellen induziert. Die Infektion von IL12 ‚knock out‘ (IL12^{-/-}) Mäusen bzw. die systemische Depletion von IL12 in infizierten Wildtyp (WT)-Mäusen führte zu 100% Mortalität nach einer *T. gondii* Infektion der

Tiere (Gazzinelli *et al.*, 1994; Yap *et al.*, 2000). In beiden Untersuchungen hatte der Mangel von IL12 eine deutlich reduzierte IFN γ Expression zur Folge.

Phagozytierende Zellen sind an der primären Produktion von IL12 beteiligt. Das Zytokin wird in der Milz von Mäusen bereits sechs Stunden nach *T. gondii* Stimulation durch lymphoide dendritische Zellen (DC) produziert (Sousa *et al.*, 1997). Diese Zellen tragen den ‚cystein-cystein chemokine receptor‘ (CCR)5 auf ihrer Oberfläche und die Bindung von *T. gondii* Cyclophilin-18 an diesen Rezeptor induziert die Produktion und Sekretion von IL12 in DC (Aliberti *et al.*, 2003). Neben der Signalvermittlung über den CCR5 Rezeptor gibt es noch weitere Wege, über die molekulare Faktoren von *T. gondii* eine IL12-Produktion in DC auslösen können. Diese Wege sind abhängig vom ‚myeloid differentiation factor‘ (MyD)88, was darauf hindeutet, dass der mikrobielle Stimulus, wie auch für andere Pathogene beschrieben, über ‚toll-like receptors‘ (TLR) vermittelt wird (Scanga *et al.*, 2002). Die Infiltration von Neutrophilen in die Bauchhöhle innerhalb von acht Stunden nach einer intraperitonealen Infektion der Maus mit *T. gondii* weist ebenfalls auf die Bedeutung der frühen IL12-Produktion für die Bekämpfung der Infektion hin (Bliss *et al.*, 2000).

IL12 wirkt auf verschiedene Sorten von Immunzellen, die auf diesen Stimulus hin IFN γ exprimieren. Dazu zählen T-Zellsubpopulationen und NK-Zellen (Suzuki, 2002). Die Produktion von IFN γ ist absolut notwendig für die Abwehr von vielen parasitären als auch bakteriellen und viralen Infektionen. IFN γ ^{-/-} Mäuse sind hochsuszeptibel gegen diese Pathogene und sterben früh an der Infektion (Scharton-Kersten *et al.*, 1996). Produzenten von IFN γ während der akuten Phase der Infektion mit *T. gondii* sind in der Maus $\gamma\delta$ T-Zellen, natürliche Killer (NK)-Zellen und noch nicht identifizierte „Nicht-T-Zellen“ (Suzuki, 2002).

$\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren einen speziellen T-Zellrezeptor (TCR), den $\gamma\delta$ -TCR, und wurden in der Milz, dem Blut und der Bauchhöhle von Mäusen gefunden, die mit *T. gondii* infiziert worden sind. Diese Zellen sezernieren bei Stimulation mit *T. gondii*-Antigen IFN γ und die Depletion der Zellen führt in der infizierten Maus früher zum Tod (Hisaeda *et al.*, 1995). NK-Zellen stellen eine weitere wichtige Quelle von IFN γ während einer Infektion mit Toxoplasmen dar. Die Depletion von NK-Zellen in der akuten Phase der Infektion führt zu einer früheren und höheren Mortalität bei infizierten Mäusen. Diese Zellen scheinen jedoch keine Bedeutung für die Kontrolle der chronischen Infektion zu haben, denn die Elimination von NK-Zellen reduziert

nicht die Resistenz von chronisch infizierten Mäusen (Kang und Suzuki, 2001). In der chronischen Phase der Infektion scheinen weitere, bisher nicht identifizierte Zellen im Gehirn infizierter Mäuse $\text{IFN}\gamma$ zu produzieren, welches für das Überleben der Tiere entscheidend ist (Kang und Suzuki, 2001). Diese Zellen sind keine T-Zellen und wahrscheinlich ebenfalls keine NK-Zellen.

Die größte Bedeutung für die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ haben T-Zellen, die durch einen $\alpha\beta$ TCR und die Expression von CD4 bzw. CD8 Molekülen charakterisiert sind. Die Bedeutung dieser T-Zellen für die Entwicklung einer Toxoplasma-Enzephalitis im Mensch zeigt sich daran, dass bei AIDS-Patienten die Abnahme der T-Zellzahl eng mit dem Ausbruch der Enzephalitis korreliert. Nackt- bzw. ‚severe combined immune deficiency‘ (SCID)-Mäuse, die keine T-Zellen entwickeln können, sterben in der akuten Phase einer experimentellen Infektion mit *T. gondii* an der ungehemmten Proliferation des Parasiten.

Die Rolle von $\text{IFN}\gamma$ für die Resistenz von Mäusen gegen *T. gondii* ist sehr komplex, da dieses Zytokin viele immunregulatorische Funktionen ausübt. Seine wichtigste Funktion ist es allerdings, antiparasitäre Effektormechanismen zu aktivieren.

Es sind bis heute mindestens fünf verschiedene Mechanismen bekannt, die die Proliferation von *T. gondii* in einer Vielzahl von Effektorzellen verhindert (Suzuki, 2002). Nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ wird in murinen Bauchhöhlenmakrophagen Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) gebildet. Durch NO wird die Proliferation von *T. gondii* gehemmt (Adams *et al.*, 1990). $\text{iNOS}^{-/-}$ Mäuse können die Parasitenreplikation in der akuten Phase kontrollieren, während sie in der chronischen Phase hochsuszeptibel sind und an einer Toxoplasma-Enzephalitis sterben (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). Ein weiterer Effektormechanismus wird in humanen Zellen nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation durch die Expression der Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) induziert. Die IDO reduziert durch Abbau von intrazellulärem Tryptophan die Proliferation intrazellulärer Pathogene (Däubener *et al.*, 2001). Neben dem starken toxoplasmastatische Effekt, der durch die Tryptophanverknappung in humanen Zellen vermittelt wird, führt die Reduktion der intrazellulären Eisenkonzentration in Darmzellen der Ratte ebenfalls zur Toxoplasmastase (Dimier und Bout, 1998). Die Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ induziert in phagozytischen Zellen die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten wie z.B. H_2O_2 , O_2^- , OH^- und $^1\text{O}_2$. Intrazelluläre Tachyzoiten werden dadurch abgetötet (Murray und Cohn, 1979; Aline *et al.*, 2002). Der fünfte Mechanismus wurde bei Mäusen identifiziert, denen das Gen

für das induzierbare GTP-bindende Protein (IGTP) fehlt. IGTP^{-/-} Mäuse sterben während der akuten Phase der *T. gondii* Infektion und sind resistent gegen andere mikrobielle Infektionen (Taylor *et al.*, 2000). IGTP spielt eine zentrale Rolle bei der IFN γ -induzierten Hemmung von Toxoplasmen in murinen Astrozyten (Halonen *et al.*, 2001) und ist vermutlich involviert in die Prozessierung immunologisch relevanter Moleküle.

1.2.2 Virulenz von *T. gondii* in der Maus

Die akute Virulenz von *Toxoplasma gondii* ist sehr gut im Mausmodell der Infektion charakterisiert. Über verschiedene Infektionsrouten können Mäuse experimentell infiziert werden, um die Virulenz von *T. gondii* zu untersuchen. Entweder werden Gehirnzysten verfüttert oder durch intraperitoneale Infektion wird der Parasit unter Umgehung der Magenpassage direkt in die Bauchhöhle gespritzt. Mit beiden Infektionsrouten können letale und subletale Infektionsdosen appliziert werden (McLeod *et al.*, 1984). Ein experimentelles Problem stellt jedoch die mangelnde Reproduzierbarkeit der Infektionsdosis bei der Verfütterung von Zysten dar. Gehirnzysten variieren deutlich in der Größe und der Anzahl der darin enthaltenen Bradyzoiten (Weiss und Kim, 2000). Für die Bestimmung der Virulenz werden deshalb naive Mäuse meistens intraperitoneal mit Tachyzoiten infiziert, wodurch die Reproduzierbarkeit verbessert und eine genaue Quantifizierung der Infektion möglich wird (Sibley *et al.*, 1999). Die Kinetik, mit der sich der Parasit im Organismus des Wirts verbreitet (Derouin und Garin, 1991), sowie die Virulenzunterschiede zwischen verschiedenen *T. gondii* Stämmen (Howe *et al.*, 1996) wurden nach intraperitonealer Infektion mit Tachyzoiten untersucht. Bei Mäusen, die intraperitoneal mit Tachyzoiten des Stamms RH infiziert worden sind, werden zuerst der Infektionsort, die Bauchhöhle und ausgehend davon die benachbarten Organe, wie Milz und Mesenteriallymphknoten befallen. Anschließend verbreitet der Parasit sich mit dem Blutstrom in die Lunge und Leber und erreicht zuletzt das Gehirn (Zenner *et al.*, 1998; Mordue *et al.*, 2001). Neben dem direkten Nachweis des Parasiten in verschiedenen Organen lässt sich der Fortschritt der Infektion in der Maus auch durch Messung des Gewichtsverlusts und die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL12 und IFN γ im Serum verfolgen. Durch die Infektion wird die Leber

geschädigt, so dass im Serum der Maus das akute Phaseprotein Haptoglobin sowie Asparagin- und Alanintransaminasen nachweisbar sind (Zenner *et al.*, 1998; Mordue *et al.*, 2001).

Es ist schon relativ lange bekannt, dass die Virulenz verschiedener *T. gondii*-Isolate stark voneinander abweicht (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1976). In der Maus lassen sich hochvirulente und relativ avirulente Isolate unterscheiden. Virulente Isolate, zu denen die *T. gondii*-Stämme RH und BK zählen, verursachen bei intraperitonealer Infektion in Mäusen eine letale Infektion. Als hinreichende Infektionsdosis genügt dafür ein einzelner infektiöser Tachyzoit, so dass die letale Dosis, bei der 100% Mortalität erreicht wird (LD_{100}), gleich eins ist (Howe *et al.*, 1996). Nach Infektion von Mäusen mit Toxoplasmen der schwach virulenten Stämme, wie z.B. ME49, DX und C56 liegt die Infektionsdosis, bei der 50% der Mäuse sterben (LD_{50}), bei über 1000 Parasiten (Sibley *et al.*, 2002).

Durch genetische und Isoenzymanalysen vieler virulenter und avirulenter *T. gondii*-Isolate konnten drei verschiedene Gruppen definiert werden, in die sich fast alle untersuchten Isolate einteilen lassen (Sibley und Boothroyd, 1992; Darde *et al.*, 1992). Alle drei Gruppen umfassen *T. gondii*-Isolate aus Tieren und Menschen, wobei der Genotyp der Isolate eine starke Korrelation zeigt mit geographischen Grenzen und der Verbreitung der Wirtsorganismen. Gruppe II-Isolate finden sich am häufigsten bei der humanen Toxoplasmose und bei Tieren, die als menschliche Nahrungsmittel genutzt werden (Howe und Sibley, 1995). Interessanterweise sind Infektionen mit Gruppe I-Isolaten, obwohl relativ selten in Tieren, mit zunehmender Häufigkeit bei der humanen kongenitalen und okularen Toxoplasmose zu finden (Fuentes *et al.*, 2001; Grigg und Boothroyd, 2001). In der Maus sind die Isolate der Gruppe I hochvirulent mit einer $LD_{100} = 1$ während Gruppe II- und III-Isolate avirulent sind mit einer LD_{50} größer 1000. Die Einteilung von *T. gondii*-Isolaten in nur drei Gruppen, die genetisch zu über 98% identisch sind, ist eine bemerkenswerte Tatsache, die bei keinem anderen protozoischen Parasit bisher gefunden wurde.

Der Polymorphismus in den bislang untersuchten Markergenen lässt sich auf maximal drei verschiedene Allelvarianten reduzieren, deren Vorkommen charakteristisch ist für die jeweilige Gruppe. In vielen Genen finden sich sogar nur zwei verschiedene Allele. Diese Fakten weisen auf die Existenz eines evolutionären Flaschenhalses hin. Nur wenige, sehr eng miteinander verwandte Klone bildeten die Ausgangspopulation für die Mehrzahl der heutigen Isolate (Grigg *et al.*, 2001; Sibley

et al., 1999). Durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analysen konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass dieser Entwicklungsschub vor etwa 10000 Jahren stattgefunden haben muss und dass die Allelvarianten der heutigen Isolate auf eine einzige Kreuzung zurückzuführen sind (Su *et al.*, 2003). Nur diese Isolate lassen sich in die von Sibley und Boothroyd 1992 beschriebenen drei Stammgruppen eingliedern. Isolate deren Ursprung etwa eine Million Jahre zurückliegt, und die nur einen Bruchteil der heutigen Isolate stellen, wurden in einer neu definierten Stammgruppe IV zusammengefasst (Su *et al.*, 2003). Während Isolate der Stammgruppen I bis III oral übertragbare Stadien im Zwischenwirt ausbilden können fehlt diese Fähigkeit den Isolaten der Gruppe IV. Die Entwicklung der Fähigkeit zur oralen Übertragung der Gewebezysten von einem Zwischenwirt auf den anderen kürzt den Lebenszyklus mit zuvor obligatorischem Wirtswechsel entscheidend ab. Diese Eigenschaft der klonalen Isolate ist einerseits ein selektiver Vorteil, der die starke Verbreitung dieser Isolate erklären kann, und andererseits verhindert die Transmission ohne obligatorische sexuelle Phase die genetische Rekombination (Su *et al.*, 2003). Dieses Modell bietet eine plausible Begründung für die klonale Homogenität der *T. gondii*-Isolate innerhalb der drei Gruppen.

Trotz der genetischen Einheitlichkeit der *T. gondii*-Isolate ist die Virulenz in Mäusen das wichtigste phänotypische Kriterium, mit dem sich Gruppe I- und Gruppe II/III-Stämme voneinander unterscheiden lassen. Welche genetischen Faktoren hier ursächlich für die deutlichen Virulenzunterschiede sind, ist unbekannt. Mittels Kreuzungsanalysen wurden bislang verschiedene Chromosomenpositionen mit der Virulenz assoziiert, jedoch konnten keine molekularen Faktoren identifiziert werden (Howe *et al.*, 1996; Grigg *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2002). Prinzipiell können Virulenzfaktoren über mindestens vier verschiedene Wege Virulenz vermitteln: a) sie induzieren eine inadäquate Immunantwort im Wirt oder b) sie verhindern die Hemmung oder Abtötung des Parasiten im Wirt oder c) sie verbessern die Wachstumsrate, was zu einer höheren Parasitenlast führt oder d) sie setzen lytische oder schädigende Faktoren frei, die direkt das Gewebe des Wirts schädigen (Sibley *et al.*, 2002). Die wenigen bisher identifizierten Virulenzfaktoren von *T. gondii* wurden alle durch Deletion einzelner Gene in virulenten Gruppe I-Isolaten gefunden. Die Deletion des GRA2-Gens führt zu einer um 30% reduzierten Virulenz in Mäusen (Mercier *et al.*, 1998). Außerdem ist das Proteanglykan-bindende SAG3 als Adhäsion

an der Invasion des Parasiten in die Zelle beteiligt, und die Deletion des SAG3-Gens reduziert die Virulenz der Mutanten um 80% (Dzierszinski *et al.*, 2000).

1.3 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Virulenzfaktoren sind Moleküle eines Pathogens, die für das Auslösen einer Krankheit im Wirt essentiell sind. Diese Faktoren lassen sich in drei Kategorien gruppieren: erstens, die Genprodukte „echter“ Virulenzgene, zweitens Faktoren, die die Expression der „echten“ Gene regulieren; und letztlich Faktoren, die die Besiedlung des Wirts durch das Pathogen ermöglichen. Bei Bakterien sind zahlreiche Virulenzfaktoren bereits identifiziert und funktionell untersucht, wie z.B. Adhärenzfaktoren, Exo- und Endotoxine sowie Transporter (Wassenaar und Gaastra, 2001). Für *Toxoplasma gondii* sind zwei Proteine als Virulenzfaktoren in der Maus beschrieben: GRA2, ein sezerniertes Protein aus den ‚dense granules‘ mit unbekannter Funktion und SAG3, ein Adhäsion auf der *T. gondii* Oberfläche.

Ziel dieser Arbeit war es, neue putative Virulenzfaktoren von *Toxoplasma gondii* zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollte das Proteom eines virulenten mit dem eines avirulenten Hybridstammes (Grigg *et al.*, 2001) sowie das Proteom von einem virulenten Isolat mit dem einer schwach virulenten Variante (Nischik *et al.*, 2001) verglichen werden. Nach Auftrennung von Proteinextrakten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese können differentiell exprimierte Proteinspots lokalisiert werden. Zu den in virulenten Toxoplasmen verstärkt exprimierten Proteinen sollten durch Sequenzanalysen homologe Moleküle in anderen Spezies identifiziert werden.

Eine Korrelation von verstärkter Expression und Virulenz muss anschließend durch genetische Modifikation virulenter bzw. attenuierter Toxoplasmen getestet werden. Durch Deletion der Gene, die für putative Virulenzfaktoren kodieren, kann in virulenten Toxoplasmen geprüft werden, ob das Fehlen dieser Faktoren die Virulenz der Toxoplasmen reduziert. Umgekehrt ist es mittels Überexpression putativer Virulenzfaktoren in avirulenten Toxoplasmen möglich, zu klären, ob diese Proteine tatsächlich die Virulenz beeinflussen. Ob und wie die Virulenz solcher Mutanten verändert ist, sollte anhand der Infektion von Mäusen untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung putativer Virulenzfaktoren von *Toxoplasma gondii*

2.1.1 Langzeit-Kultivierung reduziert die Maus-Virulenz des *T. gondii*-Isolats BK

Als Modellorganismus wurde das *T. gondii* Gruppe I-Isolat BK verwendet, welches durch kontinuierliche Passage *in vitro* attenuiert wurde (Nischik *et al.*, 2001). Die attenuierte Variante (aBK) weist im Gegensatz zum virulenten Ursprungisolats (vBK) eine reduzierte Virulenz in Mäusen auf. Die Infektion mit aBK-Toxoplasmen führt in Mäusen bei einer Infektionsdosis von 10^4 Tachyzoiten im Vergleich zur Infektion mit vBK-Toxoplasmen signifikant später zum Tod. Bereits die Infektion mit nur zehn vBK-Tachyzoiten ist letal, während bei gleicher Infektionsdosis Mäuse, die mit aBK-Toxoplasmen infiziert worden sind, überleben (Nischik *et al.*, 2001).

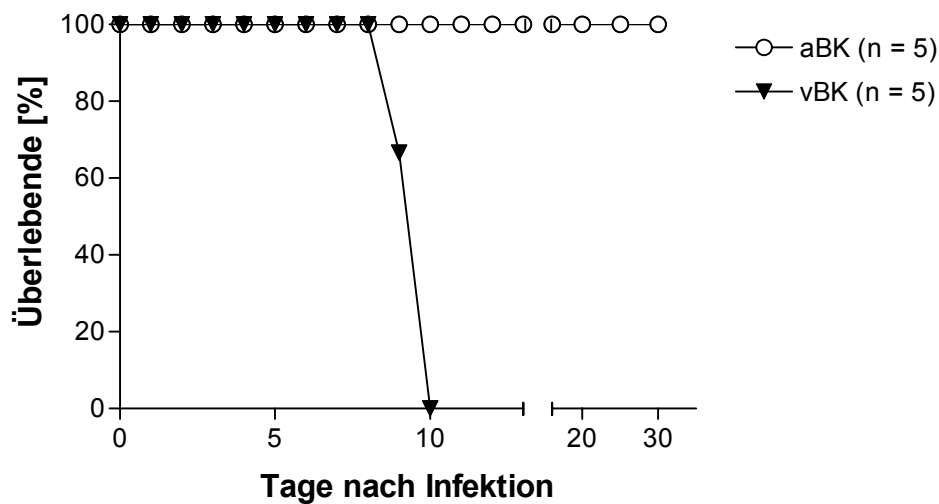


Abb. 2.1: Infektion von Mäusen mit je 100 vBK bzw. aBK Tachyzoiten. Gruppen von fünf BALB/c-Mäusen gleichen Alters und Geschlechts wurden intraperitoneal mit Tachyzoiten des Isolats BK infiziert, die zuvor kontinuierlich in Mäusen (vBK) oder in Zellkultur (aBK) passagiert worden waren. Der Verlauf der Infektion wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Dargestellt ist der Prozentanteil der überlebenden Tiere relativ zur Dauer der Infektion.

Die Attenuierung von virulenten Erregern durch *in vitro* Passage ist für Parasiten wie *Theileria annulata* bereits beschrieben (Darghouth *et al.*, 1996). Auch das *T. gondii*-

Isolat RH weist eine reduzierte Virulenz nach *in vivo* Passage in immunisierten Mäusen auf (Hakim *et al.*, 1991). Die Attenuierung wurde von Nischik *et al.* (2001) bereits beschrieben und diese Befunde hier kontrolliert. Dazu wurden zwei Gruppen zu je fünf BALB/c Mäusen mit 100 Tachyzoiten pro Maus infiziert und die Todeszeitpunkte aufgezeichnet (5.1.4). Der Verlauf der Überlebenskurve ist in Abb. 2.1 dargestellt.

Die Mäuse, die mit 100 vBK-Tachyzoiten infiziert worden waren, waren alle bis Tag 10 nach Infektion gestorben, während die Mäuse, die mit aBK-Tachyzoiten infiziert worden waren, auch 30 Tage nach Infektion alle überlebt hatten (Abb. 2.1).

Der Nachweis der tatsächlichen Infektion erfolgte durch die Messung *T. gondii*-spezifischer Antikörper im Serum aller überlebender Mäuse (5.1.4). Die Infektion mit weniger als 10^4 abgetöteten Toxoplasmen induziert in Mäusen keine spezifische anti-*T. gondii*-Immunantwort, wohingegen die *in vivo* Proliferation eines einzelnen Tachyzoiten genügt eine Serokonversion auszulösen (Mercier *et al.*, 1998). Damit kann durch den Nachweis von Antikörpern gegen *T. gondii*-Proteine im Serum überlebender Mäuse, der Infektionsstatus geprüft werden. *T. gondii*-spezifische Antikörper ließen sich bei allen Tieren, die zuvor mit aBK-Toxoplasmen infiziert worden waren, nachweisen.

2.1.2 Im Proteom attenuierter BK-Tachyzoiten ist der Gehalt distinkter Proteine reduziert

Die Suche nach Proteinen, deren Expression in der attenuierten Variante verändert waren, erfolgte durch Proteomanalyse in präparativen zweidimensionalen Gelen (5.6.8.3). Dazu wurden die Spotmuster mehrerer Gele digitalisiert und das Verteilungsmuster sowie das Spotvolumen für ca. 200 einzelne Spots in einem virtuellen ‚Master‘-Gel normalisiert (5.7.5). In der Auswertung des Vergleichs der virtuellen aBK- und vBK-‚Master‘-Gele wurden mehrere Spots von exkretorischen Proteinen identifiziert unter anderem die ‚dense granule‘ Proteine GRA2, GRA7 und NTP1 (Nischik *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine für drei weitere Spots p53, p41 und p19 identifiziert (2.1.2.4), deren Gehalt in aBK um mehr als 400% reduziert war.

2.1.2.1 Stark reduzierte Expression des p53 in attenuierten BK

Der Spot p53 (2.1.2) war in dieser Arbeit von besonderem Interesse, da dessen Volumen in den aBK-,Master'-Gelen sehr deutlich und hochsignifikant reduziert war. Das p53 Protein hat im 2D-Gel ein apparentes Molekulargewicht von 53 kDa und einen isoelektrischen Punkt von ca. 5,3 (Abb. 2.2) Das Spotvolumen ist, wie in Abb. 2.2 B erkennbar, drastisch kleiner im Lysat der aBK-Variante als bei der vBK-Variante. Die auf die Gesamtspotzahl normalisierte Quantifizierung der Volumendifferenz (5.7.5) ergab eine 8,9fache Reduktion des p53 Volumens im 2D-Gel mit aufgetrenntem aBK-Lysat (Abb. 2.2 C).

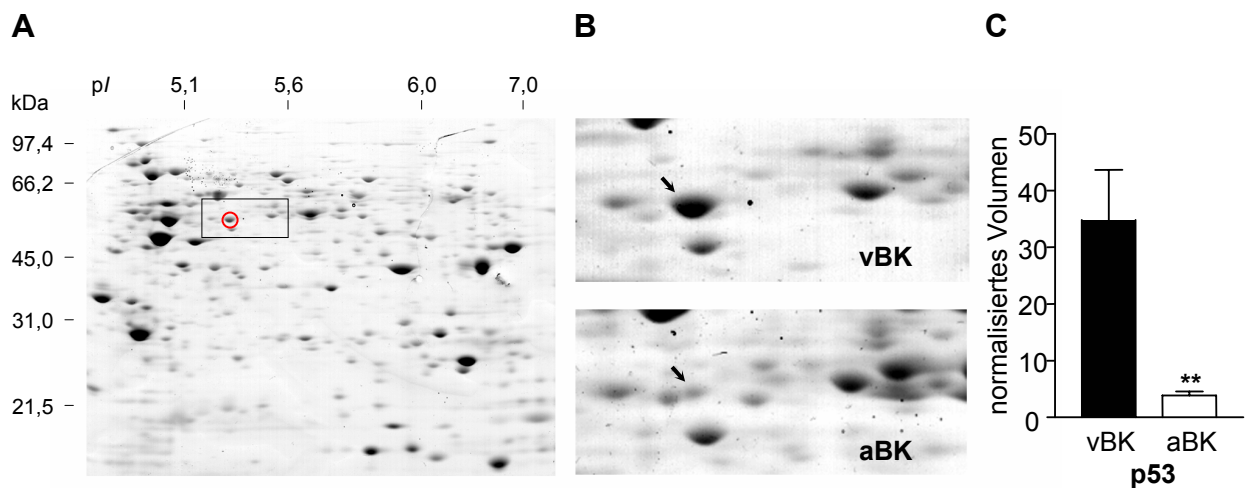


Abb. 2.2: Proteomanalyse von aBK- und vBK-Tachyzoiten. (A) Proteom der vBK-Tachyzoiten nach 2D-PAGE und Coomassiefärbung. In der im Kasten hervorgehobenen Region ist der differentiell exprimierte p53 Spot mit einem roten Kreis markiert. In (B) ist für vBK- und aBK-Toxoplasmen jeweils der Ausschnitt eines repräsentativen 2D-Gels dieser Region vergrößert dargestellt. Die korrespondierenden p53 Spots in der Auftrennung von aBK- und vBK-Lysat sind mit Pfeilen markiert. (C) Mittelwerte der p53 Spotvolumina aus sieben 2D Gelen pro BK-Variante (** markieren signifikante Unterschiede zwischen den Volumina des p53 Spots $p < 0,01$).

2.1.2.2 Identifizierung des p53 als eIF4A

Nach dem Ausstechen aus dem 2D-Gel wurde der p53 Spot mit Trypsin verdaut, wie beschrieben massenspektrometrisch analysiert (5.7.6) und es wurden drei tryptische Peptide identifiziert werden. Die Peptidmassen ließen sich direkt einzelnen Peptidsequenzen zuordnen:

Peptidsequenz	[M+H] ⁺ Masse
VVLALGDYLQVR	1345,8 Da
NDELTLEGIR	1159,6 Da
VLITDLLAR	1114,6 Da

Mit den Peptidsequenzen wurden in der BLAST2-Datenbank nach homologen Proteinen gesucht. Ergebnis dieser Suche war, dass die aus dem p53 Spot gewonnenen Peptide eine hohe Homologie zum eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor (eIF)4A aus verschiedenen Spezies aufwiesen. Die massenspektrometrische Identifikation des p53 basiert allein auf dem ausgestochenen Proteinspot und dem darin enthaltenen Protein. Um auszuschließen, dass die gefundenen eIF4A-Peptidfragmente von benachbarten Proteinspots und nicht vom p53 Spot stammen, wurde die Identifikation mit eIF4A-spezifischen Antikörpern verifiziert. Dazu wurde aus dem deduzierten offenen Leserahmen des *T. gondii* eIF4A (accession no. AJ320155) ein Peptid mit den 15 N-terminalen Aminosäuren für die Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Das gewonnene *T. gondii*-eIF4A-spezifische Antiserum wurde affinitätschromatographisch gegen das Peptid aufgereinigt. Die erhaltenen polyklonalen Kaninchenantikörper waren monospezifisch für *T. gondii* eIF4A.

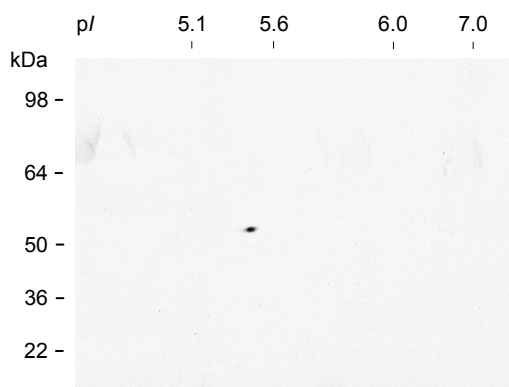


Abb. 2.3: Immunoblot von zweidimensional aufgetrenntem TLA. Immunoblot eines mit aBK-Tachyzoitenlysat beladenen 2D-Gels mit anti-eIF4A₁₋₁₅ Kaninchen-Antikörpern.

Mit diesen Antikörpern wurde im aBK-Lysat ein Protein von ca. 53 kDa und einem pI von ca. 5,3 gefärbt, was genau mit den Werten des p53 übereinstimmt (Abb. 2.3). Zur Kontrolle wurden verschiedene dem p53 benachbarte Spots einzeln aus dem negativ gefärbten Gel ausgestochen und per Immunoblot gefärbt. Keiner dieser Spots zeigte eine Reaktivität mit den anti-*T. gondii*-eIF4A-Antikörpern (nicht gezeigt). Damit wurde die Identifikation von p53 als *T. gondii*-eIF4A bestätigt.

2.1.2.3 Verifikation der differentiellen Expression von eIF4A

Die reduzierte Expression des eIF4A in aBK-Toxoplasmen wurde in 2.1.2.1 durch den quantitativen Vergleich der Spotvolumina im 2D-Gel ermittelt. Mit eIF4A-spezifischen Antikörpern erfolgte die Kontrolle dieses Befunds. Es wurden dazu gleiche Mengen an aBK- und vBK-Toxoplasmaalysat (TLA) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit eIF4A- und Laktatdehydrogenase 1 (LDH1)-spezifischen Antikörpern inkubiert. LDH1 diente als Beladungskontrolle, da der Gehalt dieses Proteins in beiden BK-Varianten vergleichbar ist (Nischik *et al.*, 2001).

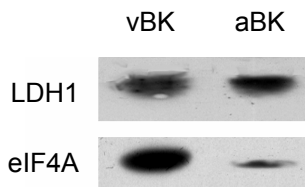


Abb. 2.4: *Quantitativer Immunoblot.* Gesamtprotein aus 10×10^6 vBK- und aBK-Tachyzoiten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit Antikörpern gegen eIF4A und LDH1 inkubiert.

In Abb. 2.4 ist deutlich zu sehen, dass die Färbung des eIF4A im aBK-Lysat im Vergleich zum vBK-Lysat stark reduziert ist. Der Nachweis der LDH1 belegt die gleiche Beladung beider Gelspuren. Eine densitometrische Quantifizierung der Immunoblotfärbung ergab die nahezu fünffach geringere eIF4A-Menge in aBK- verglichen mit vBK-Lysat.

2.1.2.4 Zwei weitere Proteine der Translation sind in aBK-Tachyzoiten geringer exprimiert als in vBK-Tachyzoiten

Neben dem Protein eIF4A wurden zwei weitere Proteine identifiziert, deren Expressionsniveau mit der Virulenz assoziiert war. Wie für eIF4A beschrieben, wurde für die beiden Proteinspots p19 und p41 ebenfalls ein reduzierter Proteingehalt gemessen und Peptidsequenzen der ausgestochenen Spots massenspektrometrisch bestimmt.

Spot	Volumen vBK/aBK	[M+H ⁺] Masse	Peptide	Bezeichnung
p41	4,4fach	1102,6 Da 1366,8 Da 1517,0 Da 926,6 Da	LSLQEDSIK FSQYVGAQAIAGR WTPGMLTNQITQK LLIVTDPR	p40/LRP accession no. AJ496758
p19	5,0fach	2840,4 Da 1503,7 Da 1273,7 Da	AEDVTFETAD DSEGNLDEVATQVK SVLVTVLQACGK	eIF5A2 accession no. AJ496759

Tab. 2.1: Zusammenstellung der massenspektrometrisch gewonnenen Daten für die Virulenz-assoziierten Proteinspots. Die Tabelle gibt den mittleren Faktor an, um den die Volumina der p41- und p19-Spots im aBK-Proteom im Vergleich zum vBK-Proteom reduziert war. Die per Massenspektrometrie ermittelten Peptidmassen für p19 und p41 sind in Spalte drei angegeben. Aus diesen Massenangaben resultieren nach Datenbankabgleich die Peptidsequenzen, für die jeweils mehrere komplementäre EST-Klone in Datenbanken identifiziert wurden. Die aus diesen EST-Sequenzen abgeleiteten offenen Leserahmen führten nach Homologievergleichen zur aufgeführten Bezeichnung. Die Genbank-Dateneinträge sind angegeben.

Die drei Peptidsequenzen des p19 Proteinspots ließen sich nach Genbankanalyse als Fragmente des *T. gondii*-Homologs des eIF5A2 identifizieren. Basierend auf den vier Peptidsequenzen des p41 Proteinspots wurde nach gleichartiger Analyse das p41 als *T. gondii* Homolog des Lamininrezeptorvorläufer p40/LRP identifiziert.

2.1.3 Proteomanalyse der *T. gondii* Stämme S22 und S23

Um die Identifikation der Virulenz-assoziierten Proteine auf eine breitere Basis zu stellen, wurde eine Proteomanalyse von zwei weiteren *T. gondii* Stämmen durchgeführt. Die hier untersuchten Stämme S22 und S23 sind die Nachkommen einer Kreuzung des Gruppe II-Isolats PDS und des Gruppe III-Isolats CEP. Beide Parentalisolats sind in der Maus schwach virulent. Nach der Kreuzung von PDS und CEP wurden die verschiedenen F1-Nachkommen auf ihre Virulenz in Mäusen untersucht. Der so erhaltene Stamm S22 ist wie seine Eltern nicht virulent in Mäusen ($LD_{50} > 1000$), im Gegensatz dazu ist der Stamm S23 hochvirulent ($LD_{100} \geq 1$) (Grigg *et al.*, 2001). Die Toxoplasmen-Präparationen beider Stämme wurden von Yasuhiro Suzuki (Blacksburg, USA) zur Verfügung gestellt. Die Proteomanalyse wurde mit Tachyzoitenlysat aus beiden Stämmen durchgeführt (5.7.1). Dazu wurden die Spotmuster von jeweils vier Gelen digitalisiert und das Verteilungsmuster sowie das Spotvolumen für einzelne Spots in einem virtuellen ‚Master‘-Gel normalisiert (5.7.5).

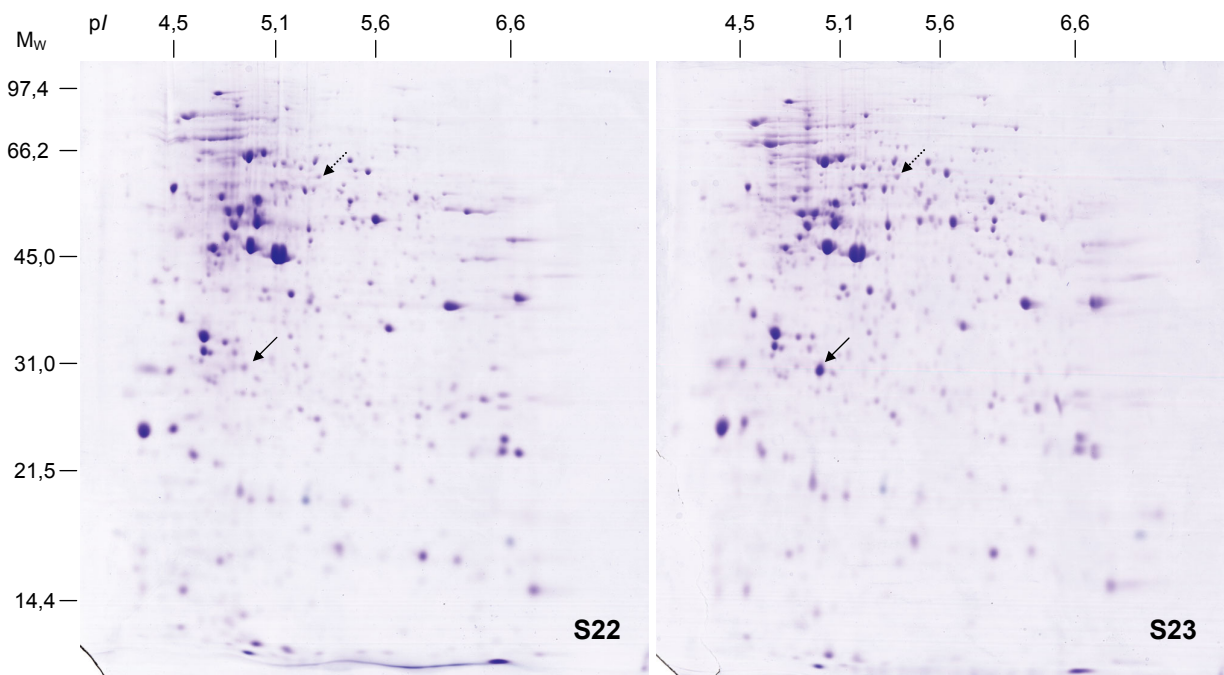


Abb. 2.5: Zweidimensionales Verteilungsmuster der Proteine für die Stämme S22 und S23. Je vier Gele, in denen Lysat von avirulenten S22- bzw. virulenten S23-Toxoplasmen aufgetrennt wurde, bildeten die Basis für das virtuelle ‚Master‘-Gel des S22 bzw. S23 Stamms. Durch Vergleich der Spotvolumina in beiden ‚Master‘-Gelen (5.7.5) wurden Proteinspots, identifiziert, deren Volumina in der Auftrennung von S22-Lysat um mehr als 300% reduziert war. Diese Spots wurden mit Pfeilen (p29 ↑, p60 ↑) markiert.

Bei der vergleichenden Analyse der Spotmuster für die Stämme S22 und S23 wurden jeweils ca. 350 distinkte Proteinspots pro 2D-Gel identifiziert und markiert. Von diesen 350 Proteinspots wurden für 254 in beiden Gelen der jeweils korrespondierende Proteinspot im Vergleichsgel zugeordnet. Von den 254 Spots wurden die auf Gesamtspotzahl normalisierten Spotvolumina (5.7.5) ermittelt und zwischen Stamm S22 und S23 verglichen. Dabei wurden nur Unterschiede in den Spotvolumina von mehr als 300% berücksichtigt. Basierend auf dieser Analyse wurden zwei Proteinspots gefunden, deren Volumen signifikant reduziert war. Der kleinere Proteinspot weist ein apparentes Molekulargewicht von ca. 29 kDa (p29), der größere Spot von ca. 60 kDa (p60) auf (Abb. 2.5). Das Volumen des Proteinspot p29 ist 3,7fach reduziert im S22-Proteom im Vergleich zum S23-Proteom. Das Volumen des p60 Spot ist 7,2fach im S22-Proteom reduziert.

Zur Identifikation der beiden differentiell regulierten Proteine bieten sich, einerseits wie in 2.1.2 gezeigt, massenspektrometrische Analysen mit aus der Gelmatrix ausgestochenen Spots an. Diese Analysen sollen zukünftig durchgeführt werden. Hier wurde mit dem Immunonachweis nach Westernblot eine weitere Möglichkeit der Identifikation von Proteinen im 2D-Gel angewendet (5.7.3.4). Der Einsatz von monospezifischen Antikörpern gegen ein einzelnes Polypeptid erlaubt den direkten Nachweis ob ein Proteinspot dieses Protein enthält.

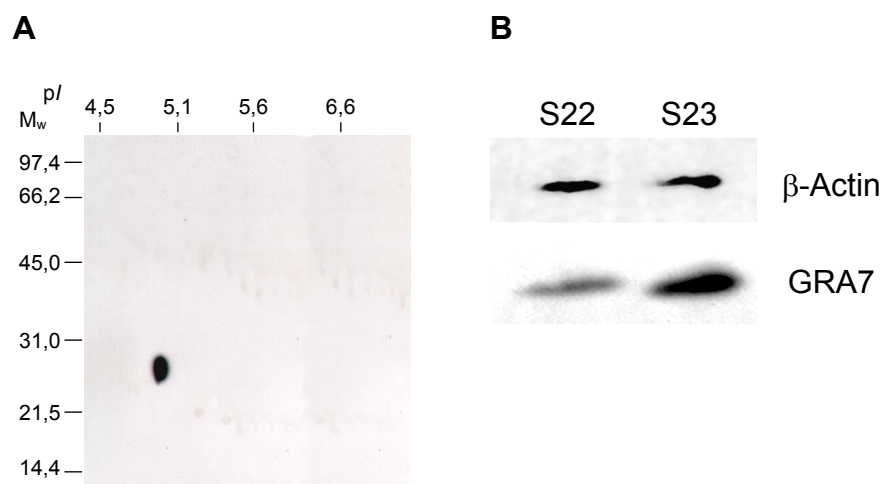


Abb. 2.6: Nachweis von p29 mit Antikörpern gegen GRA7. (A) Immunoblot eines mit S23-Tachyzoiten beladenen Coomassie-gefärbten 2D-Gels mit dem GRA7-spezifischen mAk 5-241-178. (B) Gleiche Mengen TLA des S22- und S23-Stammes wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot auf ihren Gehalt an GRA7 sowie β-Actin als Beladungskontrolle untersucht.

Für diese Analyse bot sich der p29 Spot besonders an, da seine Lokalisation im Gel sehr der bereits bekannten Position des *T. gondii* ‚dense granule‘ Proteins GRA7 ähnelt (Nischik *et al.*, 2001). Um die Hypothese zu testen, dass p29 und GRA7 identisch sind, wurde ein Westernblot mit einem der Coomassie-gefärbten 2D-Gele durchgeführt, in denen S23-Lysat aufgetrennt worden war.

Ein 2D-Westernblot zeigte ein deutliches Signal mit dem GRA7 Ak (Abb. 2.6 A). Ausschließlich der Coomassie-gefärbte p29 Spot wurde angefärbt. Der reduzierte Gehalt von GRA7 im Stamm S22 relativ zum Stamm S23 ließ sich weiterhin durch die eindimensionale Auftrennung von S22- und S23-TLA in der SDS-PAGE und nachfolgender Immunofärbung bestätigen. Der Gehalt von β -Actin war in beiden Lysaten vergleichbar, wohingegen der Gehalt von GRA7 in den S22-Toxoplasmen deutlich reduziert war (Abb. 2.6 B). Somit ist die differentielle GRA7-Expression zwischen den Stämmen S22 und S23 sowohl durch die Messung des Proteinspotvolumens im 2D-Gel als auch durch den Nachweis des GRA7-Antigens mit monoklonalen Antikörpern gesichert. Die Identifikation des GRA7 als putativer Virulenzfaktor bestätigt die bereits von Nischik *et al.* (2001) gezeigten Befunde, dass der Gehalt von GRA7 in aBK- und vBK-Toxoplasmen mit der Virulenz korreliert.

2.2 Charakterisierung des eIF4A (p53) von *T. gondii*

Die Identifizierung des eIF4A als Virulenz-assoziiertes Protein in Tachyzoiten des attenuierten und virulenten Stamm BK ließ die Frage offen, welche Funktion eIF4A für *T. gondii* hat. Besonders von Interesse war die Frage, ob eIF4A vergleichbare Charakteristika in *T. gondii* zeigt, wie es für die homologen eIF4A Proteine anderer Spezies beschrieben wurde.

2.2.1 Expression und subzelluläre Verteilung von eIF4A

Die Expression von eIF4A ist in Lysaten von Isolaten aller drei Stammgruppen nachweisbar (Abb. 2.7 A). Die Expression in allen getesteten *T. gondii* Stämmen passt dazu, dass eIF4A essentiell für die Translation von Eukaryonten ist (Gingras *et*

al., 1999). Die subzelluläre Expression von eIF4A in Tachyzoiten ist zytoplasmatisch, der Kern ist in der Immunfluoreszenzanalyse nicht gefärbt (Abb. 2.7 B).

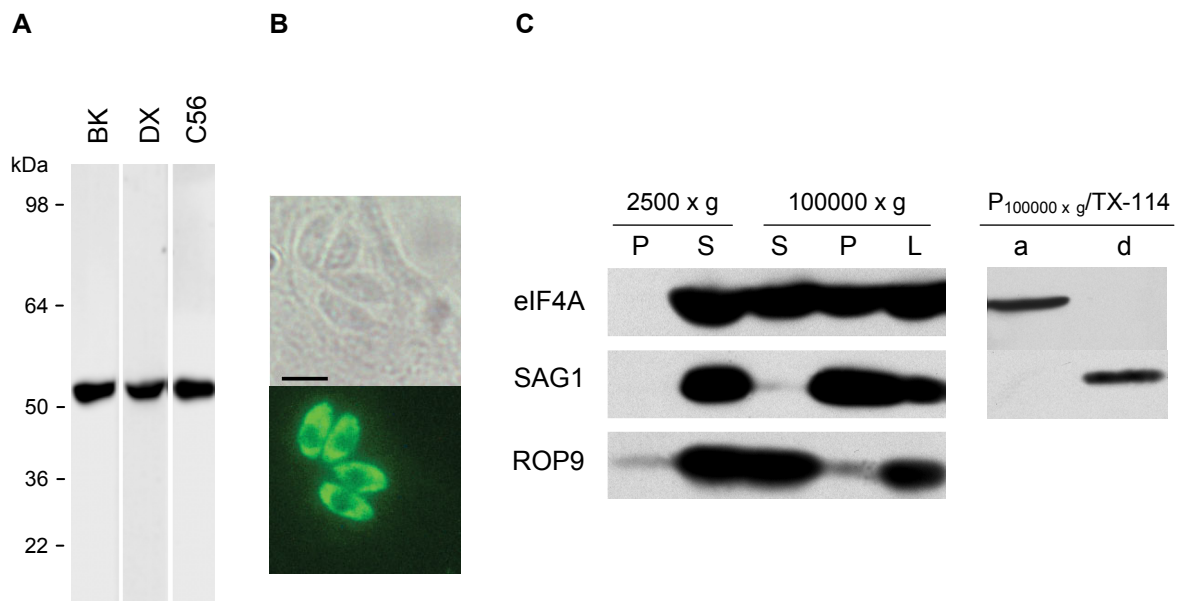


Abb. 2.7: Molekulare Charakterisierung von eIF4A. (A) eIF4A-spezifischer Immunoblot von Lysaten von repräsentativen Isolaten der *T. gondii* Stammgruppe I (BK), II (DX) und III (C56). (B) Intrazelluläre Expression von eIF4A in *T. gondii* Tachyzoiten 16 h nach Infektion der Wirtszellen. Azeton-fixierte Tachyzoiten wurden in der Immunfluoreszenzfärbung mit eIF4A-spezifischen Antikörpern inkubiert, und der Nachweis der Ak-Bindung mit FITC-markierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Gezeigt ist Phasenkontrast und Epifluoreszenzbild. (C) Subzelluläre Verteilung von eIF4A in Tachyzoitenfraktionen. Gesamtlisat (L) von 10^8 Tachyzoiten wurde differentiell zentrifugiert (5.7.2) und Pellet (P) und Überstände (S) danach im Immunoblot mit eIF4A, SAG1 und ROP9 Antikörpern analysiert. Die 100000 x g Pellet-Fraktion wurde mit Triton X-114 Partitionierung (5.7.2) weiter in wässrige (a) und Membranphase (d) fraktioniert und wie zuvor analysiert.

T. gondii LDH1 ist als zytoplasmatisches Enzym beschrieben (Reichmann *et al.*, 2001). Ein Vergleich der Immunfluoreszenzfärbung von LDH1 und eIF4A zeigte eine ähnliche Verteilung (nicht gezeigt). Die zytoplasmatische Expression von eIF4A ist wie erwartet, da die Translation im Zytoplasma stattfindet und eIF4A als Initiationsfaktor der Translation ebenfalls in diesem Kompartiment lokalisiert ist. In Abb. 2.7 C wurde Tachyzoitenlysat nach subzellulärer Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation und Triton X-114 Partitionierung mittels Immunoblot analysiert. eIF4A, das Oberflächenmolekül SAG1 und das Rhoprienprotein ROP9 waren im Toxoplasma-lysat nachweisbar. Im 100000 x g Überstand war das membranständige SAG1 fast nicht mehr nachweisbar (Mineo *et al.*, 1993), wohingegen das lösliche Molekül ROP9 in der 100000 x g-Pelletfraktion nahezu fehlt (Reichmann *et al.*, 2002). Damit wurden membranständige bzw. lösliche Proteine in dieser Fraktionierung in Pellet und Überstand angereichert. eIF4A ist jedoch sowohl

in der Pelletfraktion als auch im Überstand nachweisbar. Es liegt offensichtlich sowohl in einer löslichen und einer unlöslichen Form im Lysat vor. Um zu klären, ob eIF4A in der Pelletfraktion als integrales Membranprotein oder nur als Partikel- bzw. Membran-assoziiertes Molekül vorliegt, wurde in Abb. 2.7 C die Pellet Fraktion aus (B) mit 2% Triton X-114 partitioniert und die löslichen Bestandteile in wässrige und Detergenzphase getrennt (5.7.2). Das membranständige SAG1 (Mineo *et al.*, 1993), war in der Detergenzphase nach Partitionierung nachweisbar und nicht in der wässrigen Phase. eIF4A jedoch fand sich in der wässrigen Phase. Damit zeigt die unlösliche Form des eIF4A keinen Charakter eines Membranproteins wie SAG1, sondern scheint vielmehr nur lose an unlösliche membranöse oder partikuläre Strukturen assoziiert zu sein. Diese Strukturen sind wahrscheinlich Initiationskomplexe der Translation aus ribosomalen Untereinheiten und eIF-Faktoren.

2.2.2 Stadienspezifische Expression

2.2.2.1 eIF4A-Proteinexpression ist in Bradyzoiten reduziert

Toxoplasma gondii kann neben dem bisher untersuchten Tachyzoitenstadium auch im Bradyzoiten- bzw. Sporozoitenstadium vorliegen. Mittels Immunfluoreszenzanalysen wurde der Gehalt von eIF4A in Bradyzoiten und Tachyzoiten untersucht.

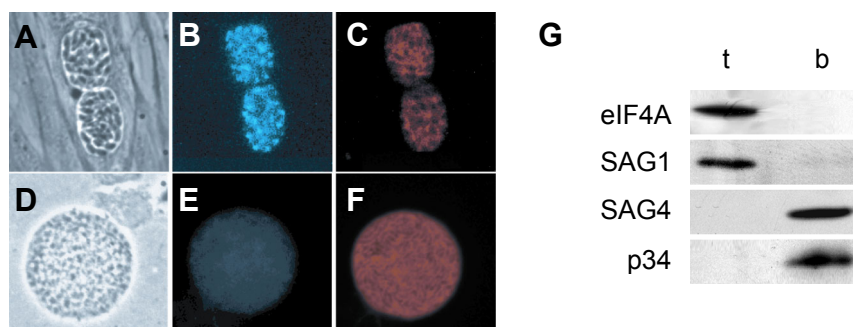


Abb. 2.8: Expression des eIF4A Proteins in Tachy- und Bradyzoiten. Immunfluoreszenzanalyse von intrazellulären Tachyzoiten (A-C) und Maus-Hirnzysten vom *T. gondii* Stamm DX (D-F). Azeton-fixierte Präparate wurden in einer Doppelfärbung mit Ak gegen eIF4A (B, E) und SAG1 (C) bzw. dem Bradyzoitenmarker 4F8 (F) gefärbt. eIF4A spezifische-Ak wurden mit AMCA-markierten, SAG1 bzw. 4F8 Ak mit TRITC-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Originalvergrößerung x 600. (G) Lysat aus 2×10^6 DX-Tachyzoiten (t) und DX-Zysten (b) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit eIF4A spezifischen Ak sowie Ak gegen SAG1, SAG4 und p34 analysiert.

Während für Tachyzoiten eine klare Expression des eIF4A beobachtet wurde, war nur eine deutlich reduzierte eIF4A Expression in Bradyzoiten nachweisbar.

Die intrazellulären Tachyzoiten exprimierten deutlich das Tachyzoiten-spezifische SAG1 Antigen, während der Bradyzoiten-spezifische Marker 4F8 die Bradyzoiten in der Hirnzyste anfärbt. Der Nachweis der stadienspezifischen Proteine in Bradyzoiten und Tachyzoiten bestätigt die im Phasenkontrast rein morphologische Identifikation von Vakuole und Zyste (Abb. 2.8 C, F). eIF4A war in den Tachyzoiten deutlich nachweisbar (Abb. 2.8 B), während die parallele Färbung von Hirnzysten nur eine sehr schwache Markierung der Bradyzoiten (E) zeigte. Dieser Expressionsunterschied *in situ* wurde im Proteinlysate bestätigt (Abb. 2.8 G). Gleiche Mengen einer Tachyzoiten- und Bradyzoiten-Lysatpräparation wurden nach SDS-PAGE im Immunoblot mit eIF4A-spezifischen Ak, sowie mit Ak gegen SAG1 und gegen die Bradyzoiten-spezifischen Proteine SAG4 und p34 getestet. Auch im Gesamtlisat ist eIF4A nur in der Tachyzoitenpräparation und nicht im Bradyzoitenlysate nachweisbar. Dennoch lassen sich mit den Bradyzoitenmarkern SAG4 und p34 Proteine im Bradyzoitenlysate nachweisen.

2.2.2.2 Die stadienspezifische Expression von eIF4A wird auf Transkriptionsebene reguliert

Der Nachweis einer reduzierten eIF4A-Proteinexpression klärt noch nicht auf welcher Ebene diese Reduktion erfolgt. Die verringerte Proteinexpression kann durch den verstärkten Abbau von eIF4A, die reduzierte Translation oder die verringerte Transkription von eIF4A-mRNA verursacht sein.

Mit der in Abb. 2.9 gezeigten semiquantitativen RT-PCR wurde die Transkription der eIF4A-mRNA mit eIF4A-spezifischen Primern untersucht. Die Reinheit der verwendeten cDNA-Proben für Tachyzoiten und Bradyzoiten wurde mit Primern für stadienspezifisch exprimierte Gene untersucht. Die Tachyzoiten-spezifischen SAG1-Transkripte (Weiss und Kim, 2000) lassen sich nur in der Tachyzoiten-cDNA nachweisen, während die Bradyzoiten-spezifischen Transkripte des BAG1 (Bohne *et al.*, 1995) nur in der Bradyzoiten-cDNA gefunden wurden. Die eIF4A-Transkripte waren in Bradyzoiten-cDNA nur bei der größten eingesetzten cDNA-Menge gerade nachweisbar, wohingegen mit Tachyzoiten-cDNA bei dieser Menge ein sehr starkes

Signal detektiert wurde. eIF4A war auch in der größten cDNA-Verdünnung der Tachyzoiten-cDNA noch nachweisbar. Eine Kontrolle der cDNA Mengen für Tachy- und Bradyzoiten erfolgte durch Amplifikation der β -Tubulin-Transkripte.

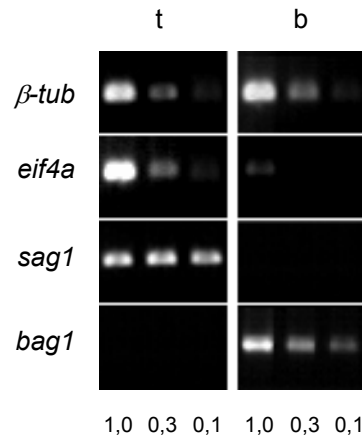


Abb. 2.9: *Semiquantitative RT-PCR von Tachyzoiten und Bradyzoiten cDNA.* Gesamt-RNA von Tachyzoiten (t) und Bradyzoiten (b) des *T. gondii*-Stammes DX wurde revers transkribiert und titrierte cDNA-Mengen (0,1 bis 1 μ l) wurden in einer PCR mit spezifischen Primern als Template eingesetzt.

Es lässt sich feststellen, dass sich die reduzierte Expression des eIF4A-Proteins bereits auf der Ebene der Transkripte widerspiegelt. Ob die reduzierte eIF4A-mRNA Konzentration in Bradyzoiten relativ zu Tachyzoiten durch die verstärkte Transkription des eIF4A-Gens in Tachyzoiten oder den verstärkten Abbau in Bradyzoiten verursacht wird, lässt sich jedoch aus diesem Experiment nicht ableiten.

2.3 Einfluss von eIF4A auf die *T. gondii* Infektion der Maus

Für die Analyse der Bedeutung des eIF4A von *T. gondii* für die Infektion der Maus sind verschiedene experimentelle Ansätze denkbar. Dazu gehört einerseits die Messung der immunologischen Reaktion der Maus auf das eIF4A Protein während der Infektion mit *T. gondii*. Hier ist speziell die Suche nach eIF4A-spezifischen Maus Antikörpern nach Infektion mit *T. gondii* zu nennen, da viele Virulenzfaktoren bei Infektionen immundominante Antigene sind (Janeway und Travers, 1997). Ein anderer Ansatz ist die genetische Modifikation der eIF4A-Expression in *T. gondii* und die Messung der Virulenz in Mäusen. Hierbei ist prinzipiell eine Inaktivierung bzw. Reduktion der eIF4A Expression in virulenten Toxoplasmen und eine verstärkte Expression von eIF4A in nicht-virulenten Toxoplasmen vorstellbar.

2.3.1 Untersuchungen von eIF4A als natürliches Antigen

Die Herstellung von eIF4A-spezifischen Kaninchenantikörpern belegt, dass im *T. gondii* eIF4A prinzipiell Epitope vorhanden sind, die von Antikörpern erkannt werden können. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Untersuchungen geprüft, ob auch das vollständige eIF4A Protein als Antigen während der Infektion eine Rolle spielt.

2.3.1.1 Rekombinante Expression von eIF4A in *E. coli*

Für den Nachweis eIF4A-spezifischer Antikörper im Serum infizierter Mäuse, war es nötig, eine reine eIF4A Protein-Präparation zur Verfügung zu haben. Dazu wurde die cDNA des *T. gondii* eIF4A in den Expressionsvektor pET29a kloniert. Das Fusionsprotein aus N-terminalem S-Tag und *T. gondii* eIF4A wurde in transformierten *E. coli* (BL21(DE3)pLysS) mittels IPTG-Induktion heterolog zur Expression gebracht. Die rekombinante Expression von *T. gondii* eIF4A in *E. coli* verlief erfolgreich, wie an der Expression des ca. 58 kDa großen Fusionsprotein in IPTG-induzierten Bakterien zu erkennen ist (Abb. 2.10).

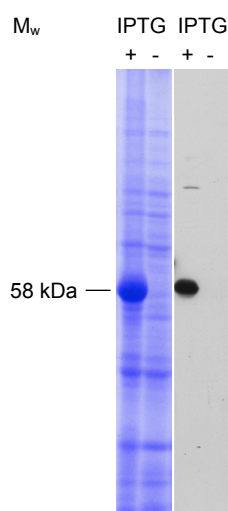


Abb. 2.10: Expression von *T. gondii* eIF4A in *E. coli*. Gezeigt ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel und Immunoblot mit *T. gondii* eIF4A-spezifischen Antikörpern. Aufgetragen wurde *E. coli* Gesamtlysate ohne (-) und nach (+) IPTG Induktion (1 mM) während der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien.

Das induzierte Protein reagierte im Immunoblot spezifisch mit *T. gondii* eIF4A-spezifischen Antikörpern, während im nicht IPTG-induzierten Bakterienlysate keine eIF4A-Reaktivität zu sehen war. Das apparente Molekulargewicht des

rekombinanten Proteins war mit 58 kDa im Vergleich zum *T. gondii*-eIF4A durch den N-terminalen S-,tag' um 5 kDa erhöht.

2.3.1.2 *T. gondii* eIF4A ist kein natürliches Antigen

Durch Westernblotanalysen von TLA und rekombinantem *T. gondii* eIF4A mit Seren infizierter Mäuse wurde die Frage untersucht, ob *T. gondii* eIF4A ein immundominantes Antigen ist. Hierzu wurden 25 µg TLA und 2 µg gereinigte Präparation der eIF4A-,inclusion bodies' in der SDS-PAGE aufgetrennt. Der Immunoblot wurde mit dem Serum einer Maus inkubiert, die 30 Tage nach Infektion chronisch infiziert war. Als Referenz wurde der gleiche Blot auch mit eIF4A-spezifischen Ak entwickelt.

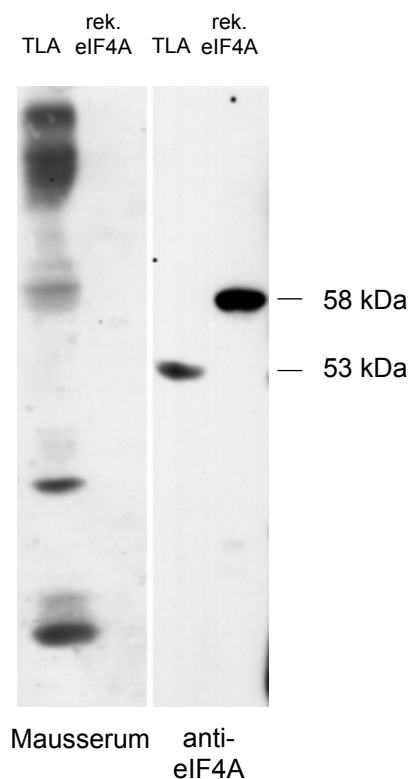


Abb. 2.11: Immunoblot mit Mausseren. Nach SDS-PAGE von 25 µg TLA bzw. 2 µg rekombinantem eIF4A wurde ein Immunoblot mit dem Serum einer chronisch infizierten Maus 30 Tage nach Infektion (Mausserum) und eIF4A-spezifischen Antikörpern (anti-eIF4A) durchgeführt.

Die eIF4A-Antikörper markierten sowohl das endogene *T. gondii* eIF4A als auch das rekombinant exprimierte eIF4A. Die Molekulargewichtsdifferenz zwischen beiden Molekülen ergibt sich aus dem N-terminal angefügten S-Tag (2.3.1.1) am rekombinanten eIF4A. Das Mausserum zeigte in der Auftrennung von TLA verschiedene charakteristische Reaktivitäten sowohl bei kleinen als auch bei sehr

hohen Molekulargewichten. Im Gegensatz dazu war keine Reaktivität des Mausserums mit dem rekombinanten eIF4A sichtbar. Da das Serum weder mit isoliertem eIF4A bei ca. 58 kDa noch im TLA eine Reaktivität im Bereich von ca. 53 kDa zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass eIF4A kein immundominantes Antigen bei einer *T. gondii*-Infektion der Maus ist. Die mit 69% Identität sehr starke Homologie zwischen *T. gondii* eIF4A und murinem eIF4A verhindert wahrscheinlich eine Erkennung als Antigen.

2.3.2 Überexpression von eIF4A in attenuierten Toxoplasmen

Die Korrelation von erhöhter eIF4A-Expression und dem virulenten Phänotyp bei vBK-Tachyzoiten ließ sich nicht mit einer Funktion des eIF4A als Antigen bei der Infektion erklären. Deshalb wurde im folgenden experimentellen Ansatz die eIF4A-Expression in den attenuierten BK durch genetische Manipulation erhöht. Die ebenfalls denkbare Strategie einer Inaktivierung bzw. Verringerung der eIF4A-Expression in virulenten BK-Toxoplasmen wurde nicht verfolgt, da eIF4A in den untersuchten Spezies wie z.B. in Hefe, Drosophila und der Maus als essentiell für die Translation angesehen wird (Gingras *et al.*, 1999).

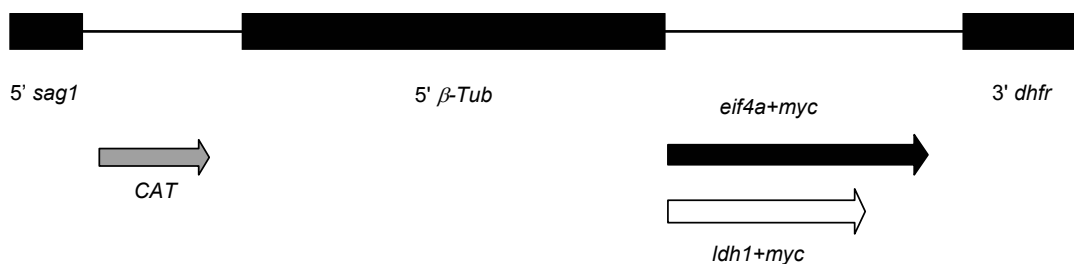


Abb. 2.12: Schematische Darstellung der Überexpressionsvektoren. Die cDNA Sequenzen für eIF4A im pEIF4A+Myc Plasmid bzw. für LDH1 im pLDH1+Myc Plasmid sind mit einem schwarzen bzw. weißen Pfeil dargestellt. Die Promotoren von β -tubulin bzw. *sag1* für die Transkription von *eif4a*, *ldh1* bzw. *cat* sind als schwarze Balken abgebildet. Die *cat*-cDNA ist als grauer Pfeil skizziert.

Die Überexpression von eIF4A in attenuierten BK-Toxoplasmen wurde durch Transfektion mit einem Expressionsplasmid erreicht. Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pTub+Myc für die eIF4A-Expression mit der cDNA für *T. gondii* eIF4A

versehen. Zur Kontrolle wurde die cDNA des LDH1-Proteins, das keine Virulenzassoziation zeigt (Nischik *et al.*, 2001), in pTub+Myc kloniert.

Von den Expressionsplasmiden pelF4A+Myc bzw. pLDH1+Myc wurden die cDNAs von eIF4A bzw. LDH1 transkribiert. Die Transkription wurde dabei vom *T. gondii* β -Tubulin-Promotor (β -Tub) kontrolliert. Beide Proteine wurden C-terminal mit einem ‚Myc-tag‘ versehen (eIF4A+Myc; LDH1+Myc). Selektionsmarker zur Generierung stabiler *T. gondii* Linien war Chloramphenicol, das bei Transfektanten von plasmidkodierter Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) inaktiviert werden kann.

2.3.2.1 Transiente Expression von eIF4A+Myc und LDH1+Myc in aBK-Toxoplasmen

Die Plasmide pelF4A+Myc bzw. pLDH1+Myc wurden durch Elektroporation in Parasiten der attenuierten BK-Variante transfiziert (5.8.3) und die Expression der Transgene nach 16 h durch Immunfluoreszenzanalyse verifiziert. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten nahezu alle transgenen Toxoplasmen die modifizierten Proteine.

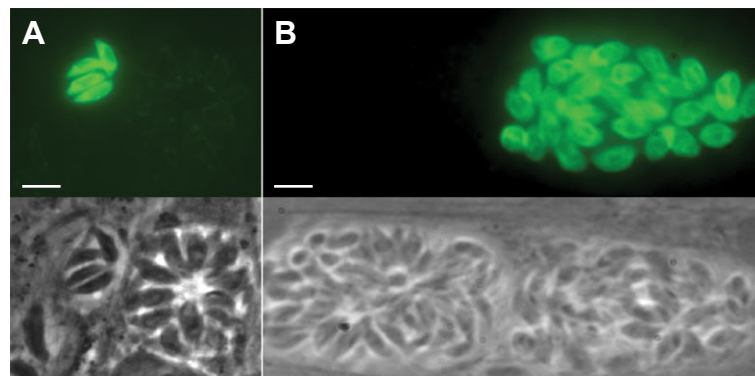


Abb. 2.13: *Transiente Expression von eIF4A+Myc und LDH1+Myc in aBK-Toxoplasmen.* Gezeigt ist die Immunfluoreszenzanalyse intrazellulärer Tachyzoiten in HS27 Fibroblasten 16 h nach der Transfektion mit pelF4A+Myc (A) bzw. pLDH1+Myc (B). Paraformaldehyd-fixierte Präparate wurden mit anti-Myc mAk gefärbt. Der Nachweis erfolgte mit FITC-markiertem Sekundärantikörper. Der Markierungsbalken entspricht 5 μ m.

Bei der Analyse der transfizierten Toxoplasmen war deutlich zu erkennen, dass die Transfektionseffizienz von aBK-Toxoplasmen mit ca. 5% sehr gering war, während für Toxoplasmen des Stamms RH eine Transfektionsrate von 50 bis 90%

beschrieben ist (Roos *et al.*, 1994). Die Toxoplasmen mit eIF4A+Myc-Expression lassen sich in der Immunfluoreszenzanalyse mit eIF4A-spezifischen Antikörpern deutlich anfärben. Die Mehrzahl der Vakuolen enthält jedoch Toxoplasmen, die kein modifiziertes eIF4A exprimieren (Abb. 2.13 A). Bei der Transfektion von aBK-Toxoplasmen mit pLDH1+Myc waren ebenfalls sowohl Vakuolen mit starker LDH1+Myc-Expression detektierbar als auch Vakuolen mit Parasiten, die keine Expression des Myc-Epitops zeigten (Abb. 2.13 B). Die Färbung der gezeigten Vakuolen beweist prinzipiell nur die Expression des Myc-Epitops. Die subzelluläre Verteilung der gefärbten Strukturen ist zytoplasmatisch und stimmt damit mit der Verteilung von eIF4A (Abb. 2.7) und LDH1 (Reichmann *et al.*, 2001) überein. Somit lässt sich sagen, dass die Plasmid-kodierten Proteine in transient transfizierten aBK-Tachyzoiten exprimiert wurden.

2.3.2.2 Expressionsanalyse der Klone aBK^{eIF4A+Myc} und aBK^{LDH1+Myc}

Die Virulenz der Mutanten in Mäusen konnte jedoch nicht mit transient transfizierten aBK-Toxoplasmen durchgeführt werden. Einerseits nahm die Expressionsstärke der Transgene durch die Segregation der Plasmide mit jeder Teilung ab. Andererseits war die Variation der Expressionsstärke zwischen den einzelnen Parasiten eines Transfektionsansatzes recht hoch. Deshalb wurde durch den Zusatz von Chloramphenicol ins Medium auf die Klone selektiert, bei denen das Expressionsplasmid stabil ins Genom integriert worden war.

Bei diesen Chloramphenicol-resistenten Parasiten wird das Plasmid, das die Resistenz vermittelt, mit den Chromosomen weitervererbt. Die Population der Chloramphenicol-resistenten Toxoplasmen erwies sich nach Immunfluoreszenzanalysen allerdings noch immer als heterogen in der Expression der Transgene eIF4A+Myc bzw. LDH1+Myc. Diese Heterogenität ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass teilweise nicht nur eine Kopie des Expressionsplasmids ins Genom integriert wurde sondern mehrere. Deshalb wurden einzelne Klone isoliert (5.8.4), deren Expressionsniveau homogen war.

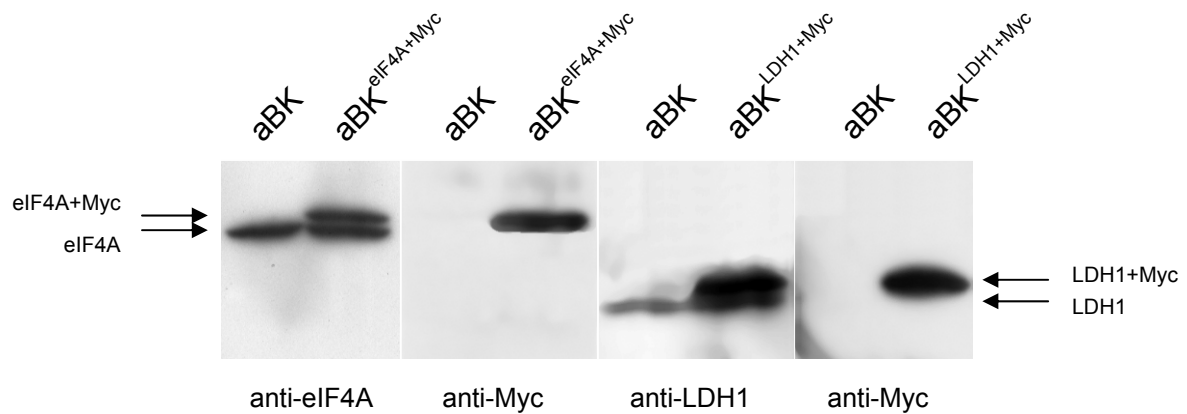


Abb. 2.14: *eIF4A* und *LDH1* Expression der Klone $aBK^{eIF4A+Myc}$ und $aBK^{LDH1+Myc}$. Es wurde Gesamtprotein aus 5×10^6 Toxoplasmen je Spur von aBK^- , $aBK^{eIF4A+Myc}$ - und $aBK^{LDH1+Myc}$ -Toxoplasmen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und zuerst mit eIF4A- bzw. LDH1-spezifischen Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit Peroxidase-markierten anti-Kaninchen Antikörpern. Nach erneutem Blocken erfolgte die Inkubation der Blots mit dem mAk gegen das Myc-Epitop und der Nachweis mit Peroxidase markierten anti-Maus Antikörpern.

Die Expressionsanalyse der $aBK^{eIF4A+Myc}$ - und $aBK^{LDH1+Myc}$ - Klone (Abb. 2.14) im Vergleich zur Ausgangspopulation der aBK belegte die Überexpression von eIF4A und LDH1 im jeweiligen Klon. Mit eIF4A-spezifischen Antikörpern zeigte sich sowohl für aBK als auch für den eIF4A-überexprimierenden Klon eine Bande bei 53 kDa. Diese Bande stammt vom dem eIF4A-Protein, das vom endogenen Wildtyp Locus kodiert wird. Das Expressionsniveau ist zwischen aBK^- und $aBK^{eIF4A+Myc}$ -Toxoplasmen vergleichbar. In der Auftrennung von $aBK^{eIF4A+Myc}$ -Lysat war ein weiteres Signal von einem Protein mit geringerer Mobilität im Gel nachweisbar, das ebenfalls von den eIF4A-spezifischen Ak markiert wurde. Bei der Entwicklung des Blots nach anschließender Inkubation mit dem Myc-spezifischen Ak, markierte der Ak gleichfalls dieses Protein. Damit ist die Expression des eIF4A+Myc-Fusionsprotein auch im stabil transfizierten Klon nachgewiesen. Parallel durchgeführte Immunfluoreszenzanalysen zeigten eine zytoplasmatische Expression des eIF4A+Myc vergleichbar der in Abb. 2.13. Die reduzierte Mobilität des eIF4A+Myc im SDS-Gel um ca. 5 kDa lässt sich nicht allein durch die Molekulargewichtsdifferenz zwischen modifiziertem und endogenem eIF4A erklären. Das angefügte Myc-Epitop besteht nur aus zwölf Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von ~ 1300 Da entspricht. Folglich müssen hier sterische Effekte eine Rolle spielen. Die Intensität der distinkten Banden von chromosomal- und Plasmid-kodiertem eIF4A können

direkt miteinander verglichen werden. Die densitometrische Quantifizierung beider Signale (5.7.3.4) zeigte eine Verdopplung der eIF4A-Expression im aBK^{eIF4A+Myc}-Klon relativ zu aBK-Toxoplasmen. Für den aBK^{LDH1+Myc}-Klon ergab die Westernblotanalyse ein ähnliches Bild (Abb. 2.14). Es lassen sich zwei Proteine mit unterschiedlicher Mobilität im aBK^{LDH1+Myc}-Klon mit den LDH1-spezifischen Ak nachweisen und das Protein mit reduzierter Mobilität wurde durch den Myc-spezifischen Ak detektiert. Die densitometrische Quantifizierung des Westernblots ergab hier eine Verdreifachung der LDH1 Expression. Die subzelluläre Verteilung des LDH1+Myc war wie beschrieben (Abb. 2.13).

2.3.3 eIF4A Überexpression erhöht die Virulenz von aBK in Mäusen

Zur Klärung der Funktion von eIF4A für die *T. gondii*-Virulenz in Mäusen wurde geprüft, ob durch das erhöhte Expressionsniveau von eIF4A die Virulenz der aBK^{eIF4A+Myc}- relativ zu aBK-Toxoplasmen verändert wurde. Dazu wurden jeweils fünf BALB/c Mäuse mit 100 Tachyzoiten i.p. infiziert und der Verlauf der Infektion für 30 Tage verfolgt (5.1.4). Jedes Inokulum wurde mit Plaquetests (5.1.4) auf seine Infektiosität geprüft. Von allen überlebenden Tieren wurde die erfolgreiche Infektion durch den Nachweis von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern im Serum bestätigt.

Alle Mäuse, die mit attenuierten BK infiziert wurden, überlebten die Infektion und erholten sich sichtbar von den Krankheitssymptomen wie glanzlosem, rauhem Fell, Schreckhaftigkeit und Tremor. Bei der Infektion mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen überlebten 13 von 15 infizierten Mäusen und erholten sich wie die Kontrolltiere, die mit aBK-Toxoplasmen infiziert worden waren, deutlich von allen Krankheitssymptomen. Diese Kontrolle war für die Bewertung der Infektion von Mäusen mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen essentiell. Die aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen sind parallel zu aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen generiert worden (2.3.2) und unterscheiden sich nur durch die Überexpression der LDH1 an Stelle von eIF4A. Unterschiede bei der Virulenz in Mäusen lassen sich somit auf das verstärkt exprimierte Protein zurückführen. Im Gegensatz zu den Mäusen, die mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren, konnten die Mäuse, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren, der Infektion nur zu einem kleinen Teil widerstehen. Drei von 15 infizierten Mäusen überlebten im Beobachtungszeitraum die Infektion mit

aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen. Die Todeszeitpunkte für die einzelnen Mäuse, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert waren, hatten eine relativ breite Streuung von neun bis 23 Tagen nach Infektion mit einem Mittelwert für den Todeszeitpunkt von 16 Tagen nach Infektion.

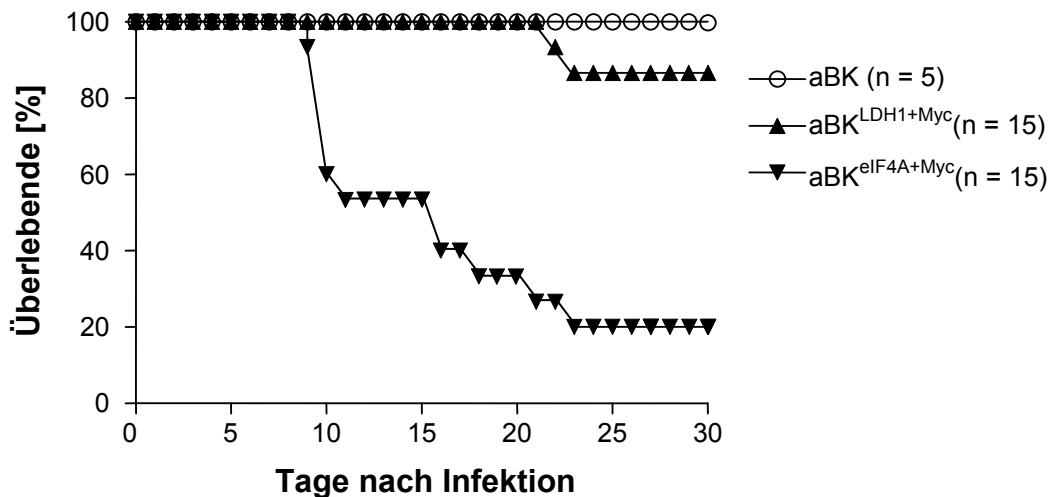


Abb. 2.15: Virulenz von aBK-, aBK^{eIF4A+Myc}- und aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen in der Maus. Gruppen von BALB/c Mäusen gleichen Alters und Geschlechts wurden intraperitoneal mit je 100 Tachyzoiten aBK-, aBK^{eIF4A+Myc}- oder aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert und die Zahl der lebenden Tiere täglich kontrolliert. Der Verlauf der Infektion wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Für die Infektion mit aBK-Toxoplasmen ist ein, für die Infektion mit aBK^{eIF4A+Myc}- und aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen die Summe aus drei identischen Experimenten mit je 5 Mäusen pro Gruppe dargestellt.

Die Mäuse befanden sich zum Todeszeitpunkt noch in der akuten Phase der Infektion. Die Erhöhung der Virulenz in den aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen im Vergleich zu aBK- bzw. aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen ist hochsignifikant ($p < 0,0001$). Trotzdem wurde die deutlich größere Virulenz des Wildtypstamms vBK durch Überexpression von eIF4A nicht erreicht. Drei Mäuse überlebten die Infektion, während eine Infektion mit vBK-Toxoplasmen bei 100% der Tiere letal verläuft (Abb. 2.1).

Weder bei den überlebenden Mäusen einer Infektion mit aBK-Toxoplasmen noch für die Infektionen mit aBK^{LDH1+Myc}- oder aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen ließen sich im Hirn Zysten als Zeichen einer chronischen Infektion, d.h. einer Persistenz des Erregers im Wirtsorganismus, nachweisen. Die Überexpression von eIF4A+Myc in aBK-Tachyzoiten zeigt in diesem Experiment eine hochsignifikante Erhöhung der Virulenz in Mäusen. Die Überexpression des Kontrollproteins LDH1, das zwischen aBK- und vBK-Toxoplasmen vergleichbar exprimiert wird, hat nahezu keinen Effekt auf die Virulenz der aBK-Toxoplasmen.

2.3.4 *In vitro* ist die Proliferation aller aBK-Mutanten vergleichbar

Die deutlichen Virulenzunterschiede zwischen aBK, aBK^{LDH1+Myc} und aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen könnten die unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten der aBK Varianten reflektieren. Falls die Proliferation der getesteten Toxoplasmen prinzipiell unterschiedlich wäre, dann müssten sich die Unterschiede auch *in vitro* messen lassen. Dazu wurde die Proliferation der Toxoplasmen in HS27-Wirtszellen über die Inkorporation von radioaktiv markiertem Uracil (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977) gemessen.

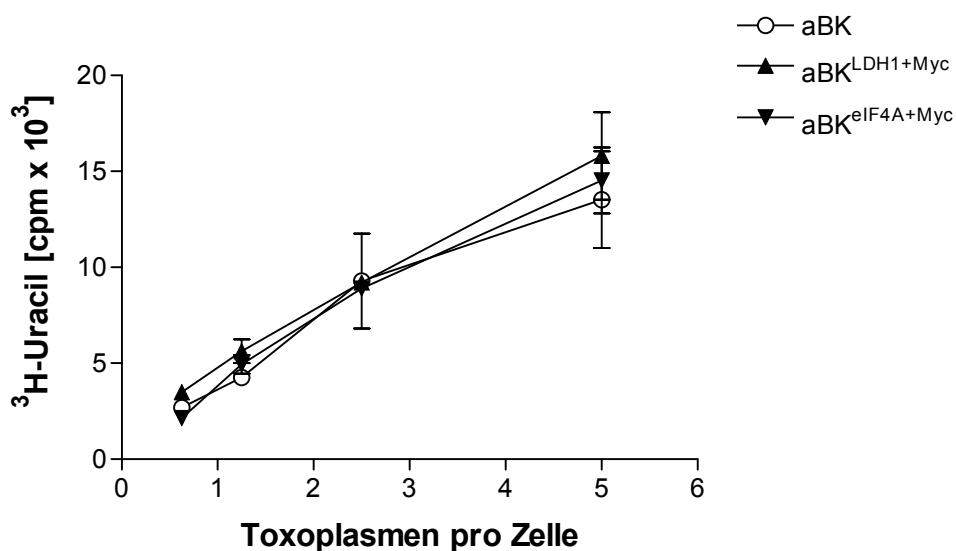


Abb. 2.16: *In vitro* Proliferation von aBK-, aBK^{eIF4A+Myc}- und aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen. Dargestellt ist die Proliferation relativ zur Infektionsrate, mit der die Wirtszellen infiziert wurden. HS27-Fibroblasten wurden in 96-well-Platten mit verschiedenen Dosen aBK, aBK^{eIF4A+Myc} oder aBK^{LDH1+Myc} infiziert und der Ansatz nach 3 h mit 37 kBq pro well ³H-Uracil markiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde nach insgesamt 24 h Inkubation gemessen.

Die Auswertung der Proliferationstests zeigte, wie in Abb. 2.16 dargestellt, bei den getesteten Infektionsdosen keinen signifikanten Unterschied der Proliferation von aBK-, aBK^{eIF4A+Myc}- und aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen. Auch weitere Untersuchungen mit Mausemakrophagen als Wirtszellen und mit verlängerter Testdauer ergaben keine Unterschiede der drei aBK-Varianten bezüglich ihrer Proliferation in Wirtszellen. Mit diesem Ergebnis lassen sich die deutlichen Virulenzunterschiede nicht erklären, da die intrinsische Proliferation der Toxoplasmen nahezu identisch ist. Offensichtlich spielen hier also weitere Faktoren wie z.B. das Immunsystem des Wirts eine wichtige Rolle. Für derartige Analysen ist das verwendete *in vitro* Modell nicht geeignet.

2.3.5 Die Infektion der Maus mit $aBK^{eIF4A+Myc-}$ und $aBK^{LDH1+Myc-}$ Toxoplasmen

Um die spezifischen Unterschiede in der Virulenz zwischen $aBK^{eIF4A+Myc-}$ und $aBK^{LDH1+Myc-}$ -Toxoplasmen *in vivo* zu untersuchen, wurde einerseits die Proliferation der Parasiten an der Inokulationsstelle und andererseits die Expression von IL12 und $IFN\gamma$ lokal und systemisch gemessen.

Dazu wurden Gruppen von BALB/c Mäusen wie in 5.1.4 beschrieben mit $aBK^{eIF4A+Myc-}$ und $aBK^{LDH1+Myc-}$ -Toxoplasmen infiziert und nach entweder drei, fünf oder acht Tagen wurden Peritoneallavage, Leukozyten aus dem Peritoneum sowie Serum gewonnen.

2.3.5.1 IL12- und $IFN\gamma$ -Serumwerte steigen während der Infektion an

Für die systemische Messung von IL12 und $IFN\gamma$ wurden die infizierten Mäuse entblutet und das Serum gewonnen (5.1.1). Im Serum wurden mittels Sandwich-ELISA (5.7.4) die Zytokine IL12 und $IFN\gamma$ quantifiziert.

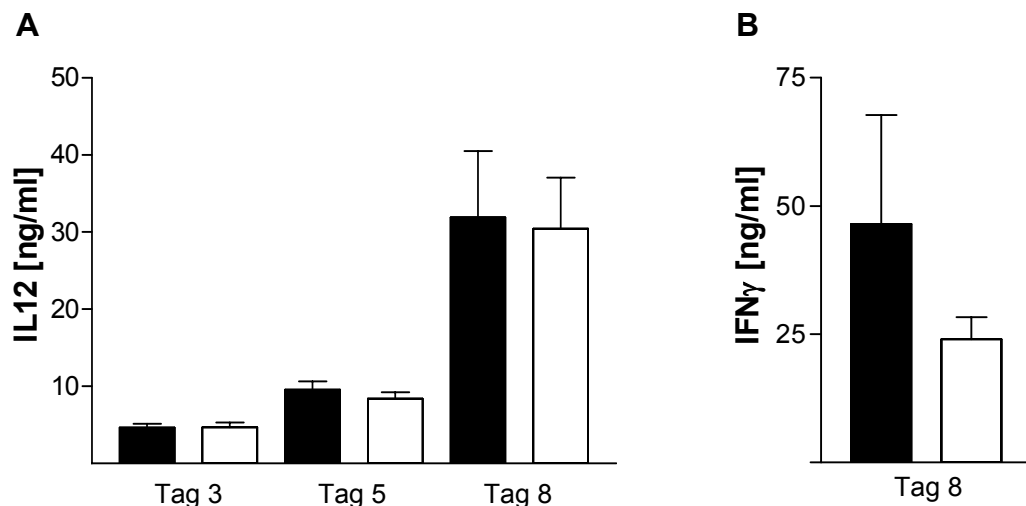


Abb. 2.17: Serumkonzentrationen der Zytokine IL12 und $IFN\gamma$. Aus Mäusen, die mit $aBK^{eIF4A+Myc-}$ ■ bzw. $aBK^{LDH1+Myc-}$ □ infiziert worden waren, wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Serum gewonnen und die Konzentrationen von IL12 (A) und $IFN\gamma$ (B) bestimmt. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert aus zwei Experimenten mit je 5 Mäusen pro Zeitpunkt. Uninfizierte Kontrollmäuse wiesen IL12 Spiegel von 2 ng/ml auf, $IFN\gamma$ war in Kontrollmäusen nicht nachweisbar.

Die IL12- und IFN γ -Konzentrationen waren im Serum der Mäuse, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren und der Mäuse, die mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren, an allen drei untersuchten Tagen nicht signifikant unterschiedlich. Bereits drei Tage nach Infektion hatte sich der Serumspiegel für IL12 (Abb. 2.17 A) mit durchschnittlich 4,6 ng/ml im Vergleich zur uninfizierten Maus mehr als verdoppelt. An Tag fünf nach Infektion erhöhte sich dieser Wert weiter bis auf durchschnittlich 9 ng/ml. Acht Tage nach Infektion lag der mittlere Serumwert für IL12 bei bereits über 30 ng/ml. Der kontinuierliche Anstieg der IL12 Konzentration im Serum korreliert mit der fortschreitenden Infektion. Dieser erste Schritt der IL12-Produktion ist in der akuten Phase der Infektion absolut entscheidend, denn er induziert die IFN γ -Produktion von T- und NK-Zellen (Suzuki, 2002). Auf dieser Stufe der Immunabwehr ist jedoch kein Unterschied zwischen Mäusen nach einer Infektion mit aBK^{eIF4A+Myc}- oder aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen zu beobachten. Damit kann ein Defekt der aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen bei der systemischen Induktion von IL12 als Ursache für die reduzierte Virulenz ausgeschlossen werden.

Der Serumspiegel für IFN γ liegt an Tag drei und fünf noch unter der Nachweisgrenze (200 pg/ml) und steigt bis Tag acht auf über 25 ng/ml Serum (Abb. 2.17 B). Die Induktion von IFN γ als Folge der IL12-Ausschüttung und damit zeitlich später in der akuten Phase der Infektion ist bekannt (Lieberman und Hunter, 2002), jedoch ist die IFN γ -Konzentration des hier gemessenen Serums im Vergleich mit Infektionen des Stamms RH erstaunlich gering (Mordue *et al.*, 2001). Trotzdem bestätigen messbare Serumwerte für IFN γ an Tag acht sowie die frühe Induktion des IL12 den Fortschritt der Infektion. Die durchschnittlich zweifach erhöhte IFN γ -Konzentration im Serum von Mäusen, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert wurden relativ zu Mäusen, die mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert wurden (Abb. 2.17 B), war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Die systemische Überproduktion von inflammatorischen Zytokinen, wie sie als Ursache der unterschiedlichen Virulenz beim Vergleich der Serumzytokine nach Infektion mit *T. gondii* Gruppe I- versus Gruppe II-Isolaten postuliert wurde (Mordue *et al.*, 2001), ist deshalb mit den vorliegenden Serumdaten nicht belegbar. Nach überstandener Infektion waren im Serum überlebender Mäuse kein IFN γ und nur leicht erhöhte IL12-Werte (etwa 4,5 ng/ml) nachweisbar.

2.3.5.2 Erhöhte aBK^{eIF4A+Myc}-Parasitenlast in der Bauchhöhle

Weder bei der systemischen Zytokinproduktion infizierter Mäuse noch bei der *in vitro* Proliferation der Toxoplasmen wurden deutliche Unterschiede zwischen einer Infektion von Mäusen mit aBK^{eIF4A+Myc}- und aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen festgestellt. Als weiterer Parameter zur Analyse der Virulenz *in vivo* wurde im Folgenden die Zahl und Infektionsrate der zum Infektionsherd einwandernden Leukozyten bestimmt. Dazu wurde die Bauchhöhle der infizierten Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten mit PBS gespült und die gewonnenen Zellen analysiert (5.1.2).

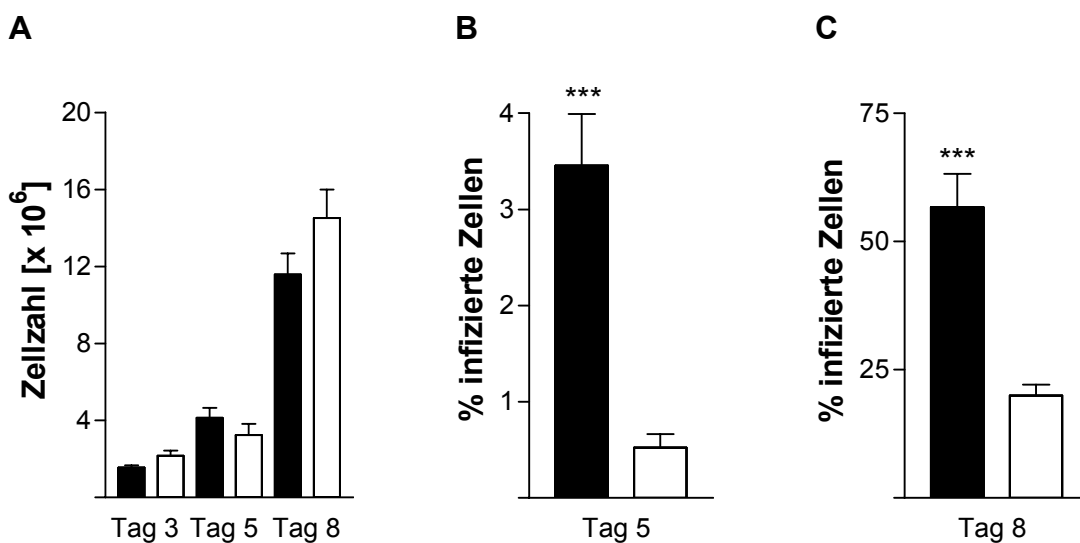


Abb. 2.18: Zellzahl und Parasitenlast der Peritonealexsudatzellen. (A) Nach drei, fünf oder acht Tagen nach Infektion von Mäusen, die mit aBK^{eIF4A+Myc}- ■ bzw. mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen □ infiziert worden waren, wurden aus der Bauchhöhle Leukozyten gewonnen und gezählt. (B, C) Je 10⁴ dieser Zellen wurden auf Objektträger fixiert und für die Immunfluoreszenzanalyse mit *T. gondii* spezifischen Ak gefärbt. Der Anteil infizierter Zellen wurde mikroskopisch durch Auszählen von jeweils 400 Zellen ermittelt. Zeitpunkte sind wie aufgeführt. Angegeben ist der mittlere prozentuale Anteil infizierter Leukozyten aus zwei Experimenten mit je 5 Mäusen pro Experiment und Tag. (***) markieren signifikante Unterschiede bei der Infektionsrate der Zellen p < 0,0001).

Die mittlere Zahl der Leukozyten, die aus der Bauchhöhle isoliert wurden, entsprach am Tag drei nach Infektion mit ca. 2 x 10⁶ Zellen (Abb. 2.18 A) der Zellzahl, die auch bei nicht infizierten Kontrollmäusen gefunden wurde. Am fünften Tag nach Infektion war die Zellzahl als Reaktion auf die Infektion bereits um ca. 2 x 10⁶ eingewanderte Zellen angestiegen. Bis Tag acht wanderten zusätzlich noch einmal weitere 8 x 10⁶ Zellen in die Bauchhöhle ein. Zusätzlich zur Erhöhung der Zellzahl nahm über den Infektionsverlauf auch das Aszites-Volumen zu. Die Anzahl der Leukozyten in der Bauchhöhle war sowohl für Mäuse, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden

waren, als auch für Mäuse, die mit $aBK^{LDH1+Myc}$ -Toxoplasmen infiziert worden waren, nicht unterschiedlich.

Obwohl bei beiden Infektionen gleich viele Zellen in die Bauchhöhle einwanderten, waren die Leukozyten aus Mäusen, die mit $aBK^{eIF4A+Myc}$ -Toxoplasmen infiziert worden waren, an Tag fünf zu $3,4 \pm 0,54\%$ mit Toxoplasmen infiziert. Im Gegensatz dazu waren Zellen aus Mäusen, die mit $aBK^{LDH1+Myc}$ -Toxoplasmen infiziert worden waren, nur zu $0,5 \pm 0,14\%$ mit Toxoplasmen infiziert (Abb. 2.18 B). Die Infektionsrate der Leukozyten aus $aBK^{eIF4A+Myc}$ infizierten Mäusen lag am Tag fünf demnach fast siebenfach über der von Mäusen, die mit $aBK^{LDH1+Myc}$ infiziert worden waren. Dieser Unterschied ist hochsignifikant $p < 0.0001$ und auch drei Tage später am Tag acht war die Infiziertheit der Leukozyten in der Bauchhöhle bei Mäusen, die mit $aBK^{LDH1+Myc}$ -Toxoplasmen infiziert worden waren, immer noch signifikant schlechter (Abb. 2.18 C). Nur knapp 20% der Leukozyten aus diesen Mäusen war infiziert, während in den Mäusen, die mit $aBK^{eIF4A+Myc}$ -Toxoplasmen infiziert worden waren, beinahe 60% der Zellen infiziert waren. Diese Unterschiede bei der Infektionsrate der Leukozyten in der Bauchhöhle deuten auf eine bessere Proliferation der $aBK^{eIF4A+Myc}$ -Toxoplasmen im Peritoneum der Mäuse hin. Dazu passend lassen sich bei überlebenden Mäusen nach einer Infektion mit $aBK^{LDH1+Myc}$ -Toxoplasmen keine Parasiten mehr nachweisen d.h. der Parasit wird eliminiert. Entsprechend klingt auch die Entzündung ab, was an der Reduktion der $IFN\gamma$ - (< 200 pg/ml) und IL12-Konzentrationen (ca. 4,5 ng/ml) im Serum der Mäuse erkennbar wird (2.3.5.1).

2.3.5.3 Die intraperitoneale Zytokinproduktion ist bei $aBK^{eIF4A+Myc}$ - und $aBK^{LDH1+Myc}$ -infizierten Mäusen vergleichbar

Es ist anzunehmen, dass die Erhöhung der intraperitonealen Parasitenlast von Mäusen, die mit $aBK^{eIF4A+Myc}$ infiziert wurden, durch einen selektiven Vorteil dieser Mutante gegenüber $aBK^{LDH1+Myc}$ -Toxoplasmen verursacht wurde. Dieser Vorteil kann einerseits direkt durch schnelleres Wachstum in der Maus herbeigeführt sein oder andererseits eine Folge der unterschiedlichen Immunabwehr in der infizierten Maus sein. Die Produktion der Zytokine IL12 und $IFN\gamma$ war im Serum, zwischen Mäusen, die mit $aBK^{eIF4A+Myc}$ -Toxoplasmen infiziert wurden und Mäusen, die mit $aBK^{LDH1+Myc}$ -Toxoplasmen infiziert wurden, nicht unterschiedlich. Trotzdem ist nicht

auszuschließen, dass neben dem Serumspiegel lokale Unterschiede im Zytokinspiegel den Verlauf der Infektion beeinflussen. Um diese Frage zu klären wurde an verschiedenen Tagen nach Infektion die Lavageflüssigkeit auf ihren Zytokingehalt untersucht.

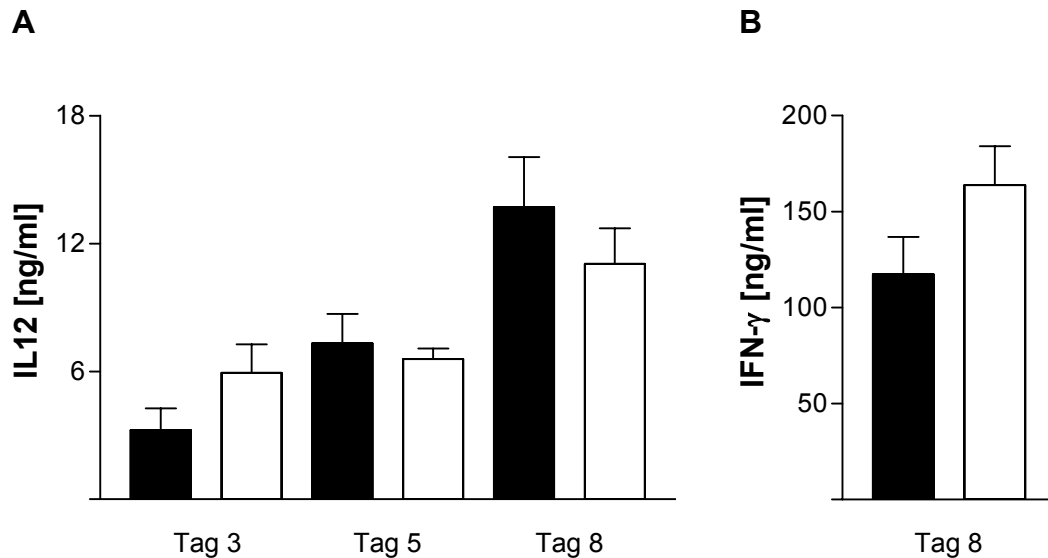


Abb. 2.19: IL12- und IFN γ -Gehalt der zellfreien Lavageflüssigkeit aus infizierten Mäusen. Nach Infektion der Mäuse mit aBK^{eIF4A+Myc}- \blacksquare oder aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen \square wurde zu den angegebenen Zeitpunkten die Bauchhöhle der Mäuse mit PBS gespült, die Zellen abgetrennt und die Konzentrationen an IL12 (A) und IFN γ (B) im Überstand bestimmt. Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten aus zwei Experimenten mit je 5 Mäusen pro Zeitpunkt. Bei uninfizierten Kontrollmäusen waren weder IL12 noch IFN γ in der Lavageflüssigkeit nachweisbar.

Signifikante Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentration in der Bauchhöhle waren nicht zu beobachten. Bereits drei Tage nach Infektion war in der Bauchhöhle mit ca. drei bzw. sechs ng/ml IL12 eine deutliche IL12-Produktion sowohl für Mäuse, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen als auch für Mäuse, die mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren, nachweisbar (Abb. 2.19 A). Bis Tag fünf nach Infektion nahm der IL12 Spiegel nur leicht auf 7,3 bzw. 6,6 ng/ml zu. An Tag acht stieg die IL12-Konzentration mit 13,7 bzw. 11,1 ng/ml noch einmal um den Faktor zwei an, blieb aber deutlich unter den Werten, die im Serum gemessen wurden (vgl. Abb. 2.17 A). Immer mehr IL12 wurde produziert. Der IL12-Ausschüttung im Peritoneum folgte, wie in Abb. 2.19 B gezeigt, eine zeitlich verzögerte starke Produktion von IFN γ (aBK^{eIF4A+Myc} 117,3 ng/ml; aBK^{LDH1+Myc} 163,8 ng/ml). Alle gemessenen Werte waren für beide Infektionen sehr ähnlich. Es fällt jedoch auf, dass die IFN γ -Konzentration in der Bauchhöhle sehr viel höher ist als im Serum

(aBK^{eIF4A+Myc} 4,6 ± 0,9fach bzw. aBK^{LDH1+Myc} 7,8 ± 0,8fach mehr). Dieses Ergebnis deutet zusammen mit der erhöhten Leukozytenzahl (Abb. 2.18 A), darauf hin, dass die Parasitämie massiv im Peritoneum konzentriert ist. Ungehemmte *T. gondii*-Proliferation im Peritoneum kann eine Peritonitis auslösen, die für Mäuse tödlich ist (Tato *et al.*, 2003).

2.3.6 GRA7 wird in aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen verstärkt exprimiert

Bei den vorhergehenden Experimenten stand die Analyse der Virulenz von eIF4A-überexprimierenden aBK-Mutanten im Vordergrund. Durch den Nachweis der erhöhten Virulenz von aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen in der Maus stellt sich nun die Frage wie eIF4A molekular die Virulenz beeinflusst. Prinzipiell bieten sich zwei Möglichkeiten an: entweder wirkt eIF4A direkt auf den Verlauf der Infektion in der Maus oder eIF4A reguliert indirekt Moleküle, die die eigentlichen Virulenzfaktoren sind. Die folgenden Experimente untersuchen die zweite Möglichkeit. eIF4A ist ein essentielles Molekül bei der Translationsinitiation und die Initiation der Translation ist die entscheidende Regulationsstufe bei translational regulierten Proteinen (Hershey *et al.*, 1996). In Hefe, *Drosophila* und *Xenopus* ist beschrieben, dass je nach eIF4A-Konzentration die Expression verschiedener Proteine induziert bzw. reprimiert werden kann (Morgan und Sargent, 1997; Daga und Jimenez, 1999; Galloni und Edgar, 1999). Dieser Effekt wird dabei wahrscheinlich durch die reduzierte Initiation der Translation für solche mRNAs vermittelt, die ungewöhnliche 5'-untranslatierte Bereiche aufweisen (Daga und Jimenez, 1999). Es wurden deshalb die Proteome von aBK- und aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen auf Expressionsunterschiede einzelner Proteine untersucht. Zu diesem Zweck wurden, analog zur Identifizierung von eIF4A (2.1.2), die Spotverteilung und Spotvolumina im Proteom der aBK- und aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen miteinander verglichen.

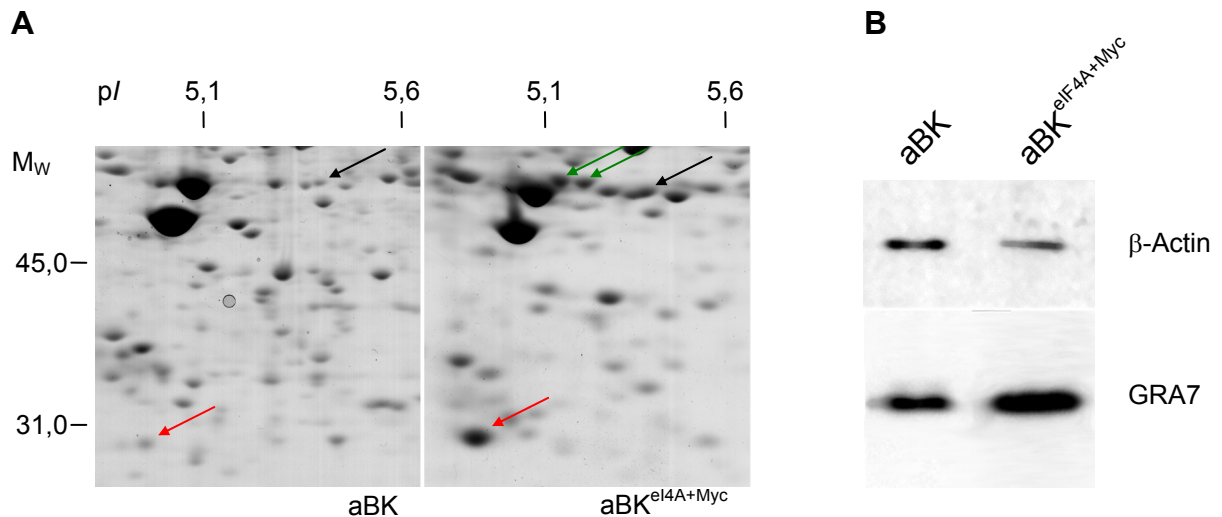


Abb. 2.20: Proteinexpression in *aBK*- und *aBK^{eIF4A+Myc}*-Toxoplasmen. (A) Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem repräsentativen 2D-Verteilungsmuster von Proteinen der attenuierten BK-Variante und der stärker virulenten *aBK^{eIF4A+Myc}*-Mutante. Bei der Analyse von vier Gelen der *aBK^{eIF4A+Myc}*-Mutante und sieben Gelen der *aBK*-Variante war das Volumen des GRA7-Proteinspots in den Gelen, in denen *aBK*-Lysat aufgetrennt wurde, immer deutlich reduziert. Mit einem Pfeil markiert sind der GRA7 Spot (↑) sowie die eIF4A+Myc Spots (↑) in der Auftrennung des Lysats der *aBK^{eIF4A+Myc}*- Mutante. Die Spots von eIF4A wurden in beiden Gelen mit einem schwarzen Pfeil markiert (↑). (B) Gleiche Mengen TLA von *aBK*- und *aBK^{eIF4A+Myc}*-Toxoplasmen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot auf ihren Gehalt an GRA7 sowie β -Actin als Beladungskontrolle untersucht.

Die Antikörper, die gegen eIF4A gerichtet sind markierten sowohl in der 2D-Auftrennung von *aBK*-TLA als auch von *aBK^{eIF4A+Myc}*-TLA einen Spot mit einem Molekulargewicht von ca. 53 kDa und einem pI von ca. 5,3. Dieser Spot ist identisch mit dem zuvor benannten p53 Spot (2.1.2). In der 2D-Auftrennung von Lysat aus *aBK^{eIF4A+Myc}*-Toxoplasmen wurden darüber hinaus noch zwei weitere Proteinspots mit einem Molekulargewicht von ca. 58 kDa und einem isoelektrischen Punkt von ca. 5,1 bzw. 5,2 markiert. Mit diesen Spots reagierte außer dem eIF4A-spezifischen Ak auch der Ak, der gegen das Myc-Epitop gerichtet ist.

Auf der Suche nach differentiell exprimierten Proteinen wurden die Spotmuster wie beschrieben (5.7.5) verglichen. Dabei fiel auf, dass der GRA7 Spot in der Auftrennung von *aBK*-TLA nur sehr schwach sichtbar war (Nischik *et al.*, 2001), aber in der Auftrennung von Lysat der *aBK^{eIF4A+Myc}*-Mutante prominent und deutlich stärker hervortrat (Abb. 2.20 A). Die Identifikation dieses Spots wurde mit Immunoblots als GRA7 bestätigt und der Befund mit eindimensionaler SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot mit Antikörpern gegen GRA7 bzw. β -Actin verifiziert (Abb. 2.20 B). Das Signal für GRA7 war sichtbar stärker im Lysat aus *aBK^{eIF4A+Myc}*-

Toxoplasmen, als im Lysat von attenuierten BK-Toxoplasmen, während β -Actin in beiden Lysaten gleich repräsentiert war.

Das *T. gondii* Protein GRA7 ist bereits als Virulenz-assoziiertes Molekül beim Vergleich der Proteome von aBK- und vBK-Toxoplasmen beschrieben worden (Neudeck *et al.*, 2002; Nischik *et al.*, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde GRA7 beim Vergleich der S22 und S23 Stämme als putativer Virulenzfaktor identifiziert (2.1.3). Die erhöhte Expression von GRA7 ist also mehrfach als Indikator für *T. gondii*-Virulenz beschrieben. Die Proteomanalyse der Stämme S22 und S23 ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Beide Stämme sind aus einer Kreuzung der Stämme CEP und PDS hervorgegangen, die unabhängig vom BK-Stamm isoliert worden sind. Im Gegensatz dazu sind alle anderen untersuchten Toxoplasmen genetisch mit dem Isolat BK verwandt. Die Korrelation zwischen Virulenz und GRA7-Gehalt im Lysat wurde somit für verschiedene Toxoplasmenstämme gezeigt.

Ausgehend von diesem Befund wurde im folgenden Teil der Arbeit eine GRA7-Deletionsmutante generiert und deren Virulenz getestet.

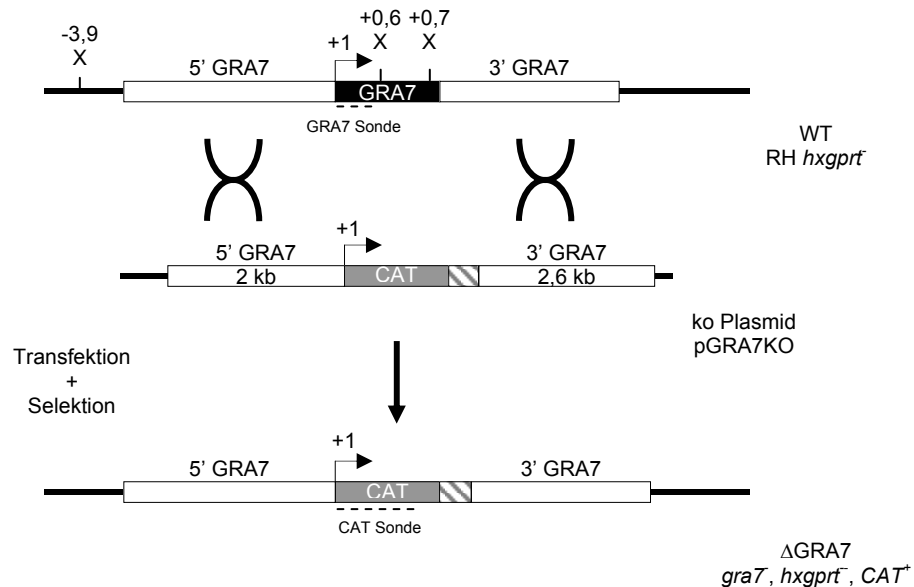
2.4 Generierung und Charakterisierung einer *GRA7*-defizienten *T. gondii* Mutante

2.4.1 Konstruktion einer *GRA7* ‚knock out‘ Mutante im Stamm RH

GRA7 ist ein sezerniertes Protein, das durch exkretorische Organellen, die so genannten ‚dense granules‘, in die parasitophore Vakuole abgegeben wird. Dort liegt GRA7 an die Vakuolenmembran assoziiert vor und spielt wie die anderen GRA-Moleküle wahrscheinlich eine Rolle bei der Nährstoffweiterleitung von der Wirtszelle zum Parasiten (Carruthers, 1999). Die Stärke der GRA7-Expression korreliert bei den *T. gondii*-Stämmen vBK und aBK (Nischik *et al.*, 2001), aBK und aBK^{eIF4A+Myc} (2.3.6) sowie S22 und S23 (2.1.3) mit der Virulenz in Mäusen. Als Ausgangsstamm für die Erzeugung der ‚knock out‘ Mutante wurde eine im *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase* (*HXGPRT*)-Gen deletierte Mutante des *T. gondii* Stammes RH gewählt (Roos *et al.*, 1994). Diese Mutante bietet erweiterte Selektionsmöglichkeiten nach Transfektion und ist gleichwohl hochvirulent wie der RH Stamm (Daten nicht gezeigt; Mercier *et al.*, 2001). In der folgenden Abbildung ist

schematisch der GRA7 Genlokus, das ‚knock out‘-Plasmidkonstrukt und der GRA7-Genlokus nach Austausch des GRA7 ORFs dargestellt.

A



B

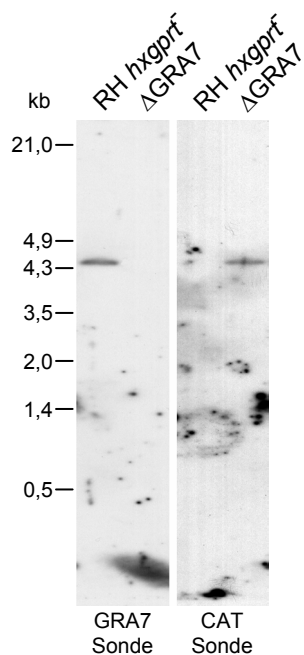


Abb. 2.21: *GRA7* ‚knock out‘-*T.gondii*. (A) Genomische Restriktionskarte und schematische Darstellung des ‚knock out‘-Vektors für die Erzeugung der *GRA7*-defizienten Mutante (Δ *GRA7*). Das Plasmid zur Generierung der Δ *GRA7*-Mutante enthält 2,0 kb des 5‘UTR und 2,6 kb des 3‘UTR (weiße Kästen). Der schwarze Kasten stellt den offenen Leserahmen von *GRA7*, der graue Kasten den für *CAT* dar. Die 3‘-seitige untranslatierte Region des *SAG1* hinter dem *CAT* ORF ist als schraffierter Kasten abgebildet. Dünne schwarze Pfeile zeigen die Translationsstarts des *CAT* und *GRA7* ORFs. *Xho*I Restriktionsschnittstellen, die für die genetische Analyse der Mutanten genutzt wurden, sind mit X bezeichnet. Die Sondensequenzen für *GRA7* und *CAT* sind mit einer gestrichelten Linie unter den ORFs markiert. (B) Southern Blot-Analyse des *GRA7*-defizienten Klon. 10 μ g *Xho*I-restringierte genomische DNA des Wildtyp-Stamms RH *hxgprf* und des *GRA7*-defizienten Klon Δ *GRA7* wurde nach Elektrophorese und Blot mit einer *GRA7*- bzw. *CAT*-komplementären Sonde hybridisiert. Die Fragmentlängen des Markers sind wie angegeben.

Die nicht homologe Rekombination eines transfizierten Genfragments ins Genom ist gegenüber der homologen Rekombination in *T. gondii* stark bevorzugt. Die Häufigkeit von homologen Rekombinationsereignissen nimmt aber mit der Länge der homologen Gensequenzen zu (Roos *et al.*, 1994). Aus diesem Grund wurden genomische DNA Sequenzen 5' und 3' seitig vom GRA7 ORF zur Konstruktion des ‚knock out‘ Vektors benötigt. Mittels der ‚genome walking‘-Methode (5.6.6) wurden überlappende Fragmente zum GRA7 ORF isoliert. Die erhaltenen DNA-Fragmente von 2 kb 5'-seitig und 2,6 kb 3'-seitig wurden sequenziert und wie beschrieben flankierend zum Selektionsmarker CAT in das Plasmid pGRA7KO kloniert (5.8.2). Nach Transfektion des RH *hxgprt* *T. gondii*-Stamms mit dem Plasmid wurden stabil transfizierte Parasiten mit Chloramphenicol selektioniert und CAT-exprimierende Tachyzoiten kloniert. 60 Chloramphenicol-resistente Klone wurden in der Immunfluoreszenzanalyse hinsichtlich der Expression von GRA7 untersucht. Vier Klone davon zeigten keine GRA7-Expression. Der *GRA7*-defiziente Klon Δ GRA7 wurde zusammen mit dem Wildtypstamm RH *hxgprt* im Southernblot auf GRA7 genomische Sequenzen untersucht. Bei der Hybridisierung von *Xho*I-restringierter RH *hxgprt* DNA markierte die GRA7-spezifische Sonde ein ca. 4,5 kb großes Fragment am Genlokus von *GRA7* (Abb. 2.21 B). Die Hybridisierung mit der DNA der *GRA7*-defizienten Mutante blieb negativ. Der Δ GRA7-Mutante fehlte also selektiv der *GRA7* Genlokus. Nach dem Southernblot war durch die Hybridisierung von *Xho*I-restringierter RH *hxgprt* DNA mit der CAT-Sonde keine homologe Sequenz detektierbar, während in der Δ GRA7-Mutante eine Genkopie des Selektionsmarkers nachgewiesen wurde. Die hier auftretende Bande ist ebenfalls 4,5 kb groß und entspricht somit dem DNA-Fragment, in das durch homologe Rekombination der ‚knock out‘-Vektor inseriert wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass genau eine Kopie des ‚knock out‘-Vektors im Genom vorhanden ist und multiple Plasmid-Insertionen ausgeschlossen sind.

2.4.2 Die Δ GRA7-Mutante zeigt keine GRA7-Expression

Die *GRA7* Deletion der Δ GRA7-Mutante wurde auch phänotypisch geprüft. Dazu wurden einerseits Immunfluoreszenzanalysen von HS27-Fibroblasten durchgeführt,

die zuvor mit Δ GRA7-Toxoplasmen infiziert worden waren und andererseits wurden Immunoblots von Δ GRA7 TLA mit GRA7-spezifischen Antikörpern untersucht.

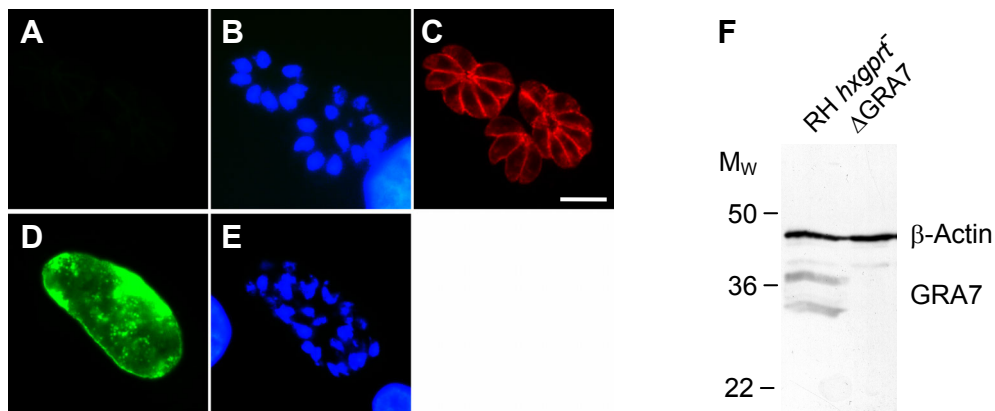


Abb. 2.22: Δ GRA7 exprimiert kein GRA7. HS27-Fibroblasten wurden mit Δ GRA7 (A-C) bzw. mit RH *hvgprt* Tachyzoiten (D, E) infiziert, fixiert und mit Ak gegen GRA7 (A, D) und einem anti-*T. gondii* Antiserum inkubiert (C). anti-GRA7 Ak wurden mit FITC- (A, D), anti-*T. gondii* Ak mit TRITC- (C) markierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Zellkern DNA wurde mit DAPI angefärbt (B, E). Der Markierungsbalken entspricht fünf μ m. (F) Intrazelluläre Δ GRA7- bzw. RH *hvgprt*-Tachyzoiten wurden aus Wirtszellen isoliert und Gesamtprotein von 10×10^6 Tachyzoiten wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit Ak gegen β -Actin und GRA7 inkubiert.

In Immunfluoreszenzanalysen von Wildtyp- und Δ GRA7-Tachyzoiten waren die Zellkerne beider Toxoplasmen mit DAPI blau anfärbbar (Abb. 2.22 E und B). Bei der Δ GRA7-Mutante war mit anti-*T. gondii* Ak eine deutliche Färbung verschiedener Strukturen auf der Oberfläche und im Zytoplasma der Parasiten zu erkennen (Abb. 2.22 C). Die Färbung mit anti-GRA7 Ak blieb bei der Δ GRA7-Mutante negativ (Abb. 2.22 A). In einer parallel durchgeführten Immunfärbung vom Wildtypstamm (Abb. 2.22 D) markierten die GRA7-spezifischen Ak punktierte Strukturen im Parasiten sowie die Membran der parasitophoren Vakuole.

Im Immunoblot (Abb. 2.22 F) von 10×10^6 aus ihren Wirtszellen isolierten Δ GRA7- und Wildtyp-Tachyzoiten wurde mit β -Actin-spezifischen Antikörpern eine Bande bei ca. 48 kDa markiert. Die Expression war in beiden Toxoplasma-Präparationen vergleichbar. Im Proteom von RH *hvgprt* sind mit den anti-GRA7 Ak zusätzlich zwei GRA7-Isoformen markiert. Das Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa wurde nur bei isolierten intrazellulären Toxoplasmen gefunden und diese Isoform zeichnete sich durch Phosphorylierung aus (Neudeck *et al.*, 2002; Reichmann *et al.*, unveröffentlicht). Bei Lysatpräparationen von extrazellulären Toxoplasmen fehlt die phosphorylierte Isoform des GRA7. Die 29 kDa Isoform ist identisch mit dem Protein

aus zuvor gezeigten GRA7-Immunoblots (Abb. 2.6 + Abb. 2.20). Weder das 38 kDa noch das 29 kDa Protein war in Δ GRA7-Tachyzoiten nachweisbar. Damit ist gezeigt, dass die Δ GRA7-Mutanten kein GRA7 exprimieren. Das Fehlen der in ihrer Mobilität reduzierten 38 kDa Bande in Δ GRA7-Toxoplasmen belegt weiterhin, dass nicht ein GRA7-kreuzreaktives Protein in intrazellulären Toxoplasmen exprimiert wird, sondern dass auch die 38 kDa Variante vom GRA7 ORF kodiert wird.

2.4.3 Proliferation der Δ GRA7-Mutante *in vitro*

Die aktuellen Hypothesen zur Funktion von GRA-Proteinen sehen diese primär als Faktoren, die im Wechselspiel zwischen Wirtszelle und Parasit eine Rolle bei der Nährstoffaufnahme oder Signaltransduktion oder Stabilisierung der parasitophoren Vakuole spielen (Mercier *et al.*, 2001). Deshalb könnte die Deletion eines dieser Faktoren das Wachstum der Toxoplasmen in ihren Wirtszellen beeinflussen. Im folgenden Experiment wurde darum die Proliferation von Δ GRA7-Toxoplasmen in HS27-Fibroblasten im Vergleich zum GRA7⁺-Wildtyp untersucht.

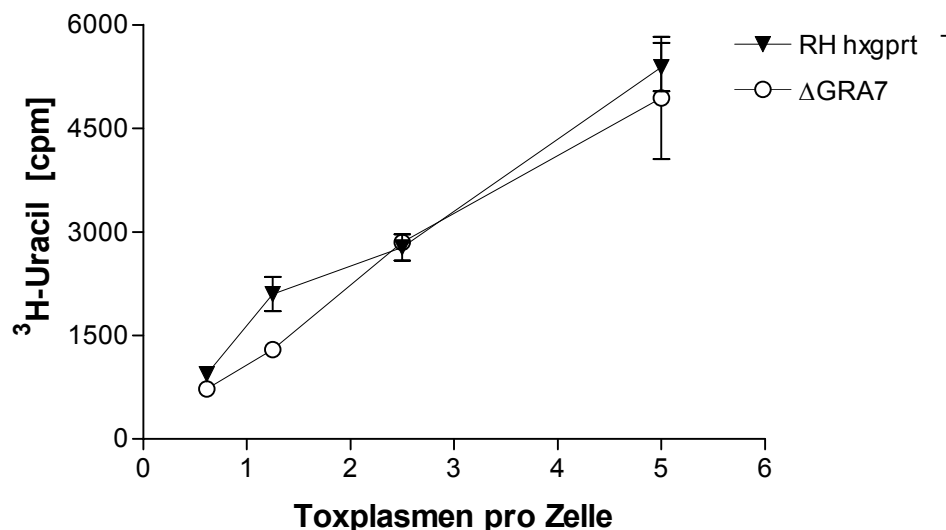


Abb. 2.23: Proliferation von GRA7⁺ Wildtyp- und Δ GRA7-Toxoplasmen in HS27-Wirtszellen. Dargestellt ist *T. gondii*-Proliferation relativ zur Infektionsrate, mit der HS27-Fibroblasten infiziert wurden. HS27-Fibroblasten wurden in 96-well-Platten mit titrierten Infektionsdosen Δ GRA7-bzw. RH *hxcprt*-Toxoplasmen infiziert und der Ansatz nach drei Stunden mit 37 kBq pro well ³H-Uracil markiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde nach insgesamt 21 h Inkubation gemessen.

Die Auswertung der Proliferationstests ergab keinen signifikanten Unterschied der Wachstumsraten von RH *hxgprt* und Δ GRA7-Toxoplasmen (Abb. 2.23). Die Proliferation der beiden Toxoplasmenstämme war auch in weiteren Untersuchungen mit verlängerter Testdauer und anderen Infektionsraten identisch. In ähnlichen Untersuchungen war die Proliferation von Mutanten, deren *GRA2*, *GRA5* oder *GRA6* Gen deletiert war, zum Wildtyp-Stamm ebenfalls nicht verändert (Mercier *et al.*, 1998, 2001, 2002).

2.4.4 Die Virulenz der Δ GRA7-Mutante ist unverändert zum Wildtyp

Eine der interessanten Konsequenzen einer *GRA2*-defizienten Mutante ist es, dass 30% der Mäuse, die mit dieser Mutante infiziert werden, die Infektion überleben und eine chronische Infektion mit der Ausbildung von Hirnzysten entwickeln (Mercier *et al.*, 1998). GRA-Proteine könnten also eine Rolle für die Virulenz von *T. gondii* in Mäusen spielen. Die erhöhte Expression von GRA7 in den virulenten Toxoplasmastämmen vBK (Nischik *et al.*, 2001), S23 (2.1.3) und aBK^{eIF4A+Myc} (2.3.6) macht auch GRA7 als Virulenzfaktor vorstellbar.

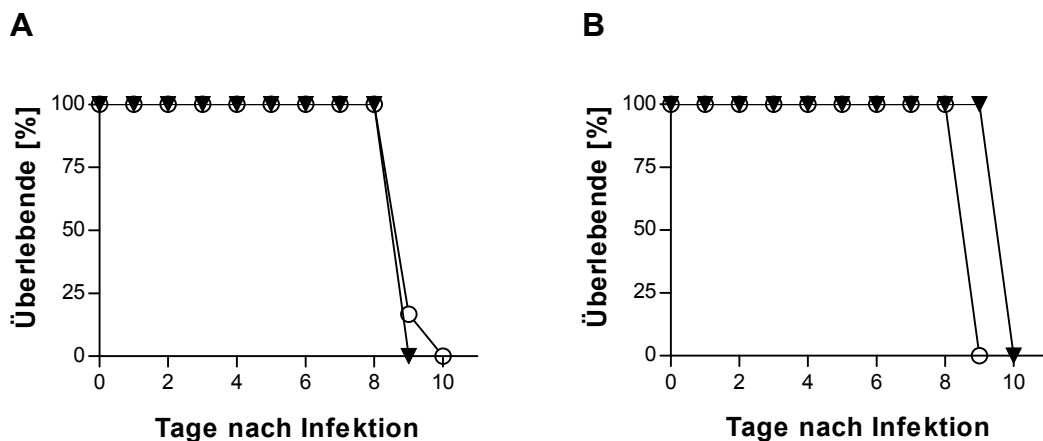


Abb. 2.24: Virulenz von RH *hxgprt* (—▲—) und Δ GRA7 (—○—) in Mäusen. Gruppen von vier bis acht BALB/c Mäusen gleichen Alters und Geschlechts wurden intraperitoneal mit je 100 Tachyzoiten (A) oder zehn Tachyzoiten (B) infiziert und die Zahl der lebenden Tiere täglich kontrolliert. Bei der Infektion mit 10 Tachyzoiten wurden seronegative überlebende d.h. nicht infizierte Mäuse aus der Wertung genommen (RH *hxgprt* 2/8 bzw. Δ GRA7 3/8; Seronegative/Gesamtzahl).

Um diese Hypothese in einem Vorversuch zu testen wurden vier BALB/c Mäuse mit 100 Wildtyp-Tachyzoiten und sechs BALB/c Mäuse mit 100 Δ GRA7-Tachyzoiten i.p. infiziert (5.1.4). Das Inokulum wurde mit Plaqueassays (5.4.4) auf seine Infektiösität

geprüft und war bei allen Infektionen vergleichbar infektiös. Keine der mit 100 Tachyzoiten infizierten Mäuse überlebte die Infektion (Abb. 2.24 A). Nur eine einzige Δ GRA7 infizierte Maus überlebte noch bis Tag zehn nach Infektion, alle anderen Mäuse starben an Tag neun nach Infektion. In diesem Experiment war die Virulenz der Δ GRA7-Toxoplasmen insofern identisch zum Wildtyp, als dass keine Maus die Infektion überlebte. Trotzdem überlebte eine Δ GRA7-infizierte Maus einen Tag länger. In einem zweiten Experiment sollte mit gesenkter Infektionsdosis von zehn Tachyzoiten das erste Ergebnis kontrolliert werden. Außerdem bieten geringe Infektionsdosen die Möglichkeit auch kleine Unterschiede in der Kinetik des Infektionsverlaufs zu messen. Die Verlängerung des Überlebens kann so gemessen werden, auch wenn keine Maus die Infektion überlebt.

Im zweiten Experiment (Abb. 2.24 B) wurden jeweils acht Mäuse mit zehn Wildtyp- bzw. Δ GRA7-Tachyzoiten infiziert und der Infektionsverlauf beobachtet. Bei gleicher Infektiösität der Inokuli starben hier fünf der acht Mäuse nach Infektion mit Δ GRA7-Toxoplasmen und sechs von acht Mäusen, die mit RH *hxgprt* Toxoplasmen infiziert wurden. In den Seren der fünf überlebenden Mäuse waren 30 Tage nach Infektion keine *T. gondii*-spezifischen Ak nachweisbar. Damit kann davon ausgegangen werden, dass diese Mäuse gar nicht infiziert wurden. Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass die tatsächliche Infektiösität des Inokulums bei frisch geernteten Toxoplasmen meistens zwischen 40 und 60% der mikroskopisch zählbaren Parasiten liegt. Damit kann es bei geringen Infektionsdosen dazu kommen, dass sich weniger als ein infektiöser Tachyzoit im Inokulum befindet und die Mäuse nicht infiziert werden.

Alle infizierten Mäuse starben an der Infektion. Mäuse, die mit Δ GRA7-Toxoplasmen infiziert wurden, starben dabei sogar einen Tag vor den Mäusen, die mit dem Wildtyp infiziert wurden. Es lässt sich somit definitiv feststellen, dass die Virulenz von Δ GRA7-Toxoplasmen in Mäusen nicht reduziert ist.

3 Diskussion

3.1 Identifizierung Virulenz-assoziiertes mikrobieller Proteine

Toxoplasma gondii kann als obligat intrazellulärer Parasit ohne Wirtszelle nicht überleben und hat somit verschiedene Mechanismen entwickelt, die eine anhaltende effektive Infektion des Wirts garantieren. Für das Wachstum des Parasiten in Zellkulturen sind einige dieser Mechanismen nicht essentiell. Der Verlust von Mechanismen, die im Wirtsorganismus Virulenz vermitteln, beeinträchtigt nicht die Proliferation des Parasiten in der Zellkultur. So ist zum Beispiel die Proliferation der schwach virulenten Toxoplasmenstämme S22 bzw. aBK im Vergleich zu virulenten Stämmen wie S23 bzw. vBK in der Zellkultur nicht reduziert (Grigg *et al.*, 2001; Nischik *et al.*, 2001). Auch beim Vergleich natürlicher *T. gondii*-Isolate der virulenten Gruppe I mit Isolaten der Maus-avirulenten Gruppen II und III ist die *in vitro* Proliferation von Tachyzoiten aus Gruppe I-Isolaten nur geringfügig höher als die von Gruppe II und III-Isolaten (Sibley *et al.*, 2002). Folglich gibt es bei virulenten *T. gondii*-Isolaten, wie auch für Bakterien beschrieben, Faktoren, die zwar die Virulenz vermitteln, dabei aber für das Wachstum *in vitro* nicht von Bedeutung sind. Bei ‚differential display‘-Analysen virulenter und nicht virulenter Toxoplasmen sollten primär Faktoren identifiziert werden, deren Expression ursächlich ist für die Krankheit des Wirts.

Für derartige Untersuchungen bieten sich verschiedene ‚screening‘-Strategien an. Dazu zählt einerseits die Analyse des Transkriptoms beider Isolate mittels subtraktiver cDNA Banken oder Genchips. Genchips wurden bislang noch nicht verwendet, da die dafür notwendigen Sequenzinformationen zur Herstellung von Hybridisierungsproben in Gendatenbanken bisher nur unzureichend vorliegen. Subtraktive cDNA Banken wurden bereits zur Identifikation stadienabhängig exprimierter Gene eingesetzt (Manger *et al.*, 1998), jedoch noch nicht, um Virulenzfaktoren zu entdecken. Beide Methoden verschaffen nur Informationen über Transkript- nicht über Proteinexpression. Die Möglichkeit, komplexe Proteingemische in zweidimensionalen Gelen so aufzutrennen, dass distinkten Spots einzelne Proteine zugeordnet werden können, erlaubt einen direkten Vergleich der Proteome verschiedener Organismen (Klose und Kobalz, 1995). Die Proteomanalyse ist für

verschiedene bakterielle Pathogene schon als eine Methode bei der Identifikation von Virulenzfaktoren etabliert (Jungblut *et al.*, 1999; Piechaczek *et al.*, 2000; Cordwell *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2001). Durch Proteomanalysen wurde bei Salmonellen nachgewiesen, dass die Veränderung des Mediums von saurem zu neutralem pH-Wert die Expression von Flagellenproteinen induziert (Adams *et al.*, 2001). Am Beispiel des uropathogenen *E. coli*-Stammes 536 wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese 34 verschiedene Proteine identifiziert, die in virulenten und avirulenten Derivaten differentiell exprimiert wurden. Die Expression dieser Faktoren hing dabei davon ab, ob im Genom so genannte ‚Pathogenitätsinseln‘, welche für tRNA-Gene kodieren, integriert waren (Piechaczek *et al.*, 2000). Für *T. gondii* sind solche Analysen bislang nur beim Vergleich der Proteome von aBK-Tachyzoiten und vBK-Tachyzoiten angestellt worden (Nischik *et al.*, 2001; 2.1.2).

Zur Identifikation von Genen, die als putative Virulenzfaktoren in Frage kommen, sind ebenso kreuzungsgenetische Kartierungen geeignet. Damit haben bereits Howe *et al.* (1996) Untersuchungen bei natürlichen Nachkommen einer Kreuzung von Gruppe I- und Gruppe III-Toxoplasmen durchgeführt. Die dort aufgestellte Korrelation zwischen dem SAG1 Genlocus auf Chromosom VIII und der Virulenz in Mäusen wurde jedoch von der gleichen Arbeitsgruppe kürzlich als rein zufällige Korrelation interpretiert (Su *et al.*, 2002). Durch experimentelle Kreuzungen von Gruppe III-Isolaten mit Gruppe II-Isolaten (Grigg *et al.*, 2001) bzw. von Gruppe I-Isolaten mit Gruppe III-Isolaten (Su *et al.*, 2002) wurden mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern distinkte Regionen auf den Chromosomen III und IV bzw. IV und VII mit Virulenz assoziiert. Beide Arbeiten interpretieren die Verteilung der Virulenz-assoziierten RFLP-Marker auf verschiedene Positionen im Genom als Indiz dafür, dass der Phänotyp ‚hochvirulent‘ nicht durch ein einziges Gen, sondern durch verschiedene, vielleicht voneinander abhängige Faktoren bestimmt wird. Die absolute Zahl dürfte dabei jedoch relativ gering sein (Sibley *et al.*, 2002). Ein Problem derartiger Analysen ist die relativ geringe Zahl von genetischen Markern, die die Auflösung genetischer Karten entscheiden. Der beschriebene ‚forward genetics‘ Ansatz hat jedoch gerade wegen der mangelnden Auflösung der Genkarte den Nachteil, dass die identifizierten Chromosomabschnitte mit ca. 1500 kb sehr groß sind. Die Zahl der darin enthaltenen Kandidatengene ist damit zu groß, um alle einzeln als mögliche Virulenzfaktoren zu untersuchen.

Bei der vergleichenden Analyse des Lysats aus virulenten und attenuierten Toxoplasmen wurden einzelne Proteine identifiziert, deren ‚steady-state‘ Synthese mit der Virulenz assoziiert ist. Dabei wurde gezeigt, dass es bei der Proteomanalyse von S22 und S23 Toxoplasmen eine signifikante Korrelation zwischen erhöhtem GRA7-Gehalt und der Virulenz in Mäusen gibt. Der Gehalt von GRA7 ist in den virulenten S23-Toxoplasmen im Vergleich zu S22-Toxoplasmen fast vierfach erhöht. Dieses Ergebnis entspricht früheren Befunden, bei denen die ‚steady-state‘ Synthese des GRA7 in attenuierten BK-Tachyzoiten im Vergleich mit virulenten BK-Tachyzoiten fast 40fach reduziert war (Neudeck *et al.*, 2002). Aus der Analyse der genetisch veränderten aBK-Mutanten (2.3.6) lässt sich ebenfalls eine Korrelation zwischen GRA7-Gehalt und *T. gondii*-Virulenz ableiten. Neben dem sekretorischen Molekül GRA7 wurden mit diesem Ansatz auch funktionelle Moleküle der Translationsinitiation als putative Virulenzfaktoren identifiziert. Die drei in aBK-Toxoplasmen reduziert exprimierten Moleküle eIF4A, eIF5A2 und das Protein p40/LRP (2.1.2.4) sind bei der Initiation der Translation von Eukaryonten beteiligt (Ford *et al.*, 1999; Rogers, Jr. *et al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 2001). eIF5A2 ist ein nur wenig charakterisiertes Molekül, das während der Translationsinitiation die ribosomale Peptidyl-Transferase stimuliert und wahrscheinlich auch eine Funktion beim mRNA Transport hat (Jenkins *et al.*, 2001). Die Funktion von p40/LRP wurde kontrovers diskutiert, da es einerseits Homologien zum 67 kDa Laminin-Rezeptorvorläufer und andererseits zu ribosomalen Proteinen der S2 Familie aufweist (Narasimhan *et al.*, 1994; Kazmin *et al.*, 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen (Demianova *et al.*, 1996; Ford *et al.*, 1999; Ardini *et al.*, 1998) konnten jedoch experimentell und durch intensive Analyse von phylogenetischen Stammbäumen zeigen, dass das Protein nur in Vertebraten auch als Lamininrezeptor fungiert. In weniger komplexen Organismen findet man keine Lamininbindung an das Protein, sondern p40/LRP ist hier Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit und hat eine Funktion während der Initiation der Translation (Demianova *et al.*, 1996). Die Charakteristika von eIF4A werden in 3.2.1 besprochen.

Das in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsscreening per Proteomanalyse identifiziert nur mögliche Virulenzfaktoren. Die Korrelation von Expression und Virulenz musste vor einer Identifikation als Virulenzfaktor experimentell bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden, wie beschrieben (2.3.3; 2.4.4), in einem ‚reversed genetics‘ Ansatz ausgesuchte Kandidatengene auf ihre Beteiligung an der Virulenz

getestet. Es gibt dazu prinzipiell zwei verschiedene Möglichkeiten, diesen Ansatz zu verfolgen: einerseits kann durch Überexpression von Virulenzfaktoren in einem nicht virulenten *T. gondii*-Stamm untersucht werden, ob diese Toxoplasmen an Virulenz gewinnen; andererseits kann durch gezielte Deletion einzelner Gene bei virulenten Isolaten geprüft werden, ob die Virulenz der Toxoplasmen durch diesen Eingriff reduziert wurde. Alle bislang bei *T. gondii* entdeckten Virulenzfaktoren wurden über die Deletion eines Gens definiert (Mercier *et al.*, 1998; Dzierszynski *et al.*, 2000; Fox und Bzik, 2002; Meissner *et al.*, 2002). Durch Überexpression von Faktoren in avirulenten Stämmen können allerdings auch Gene, deren Deletion für *T. gondii* letal ist, auf ihre Beteiligung bei der Virulenz untersucht werden.

3.2 eIF4A, ein neuer Virulenzfaktor von *T. gondii*

3.2.1 eIF4A ist ein stadienabhängig exprimierter

Translationsinitiationsfaktor in *T. gondii*

Bei der Analyse des Proteoms von virulenten und attenuierten BK Toxoplasmen wurde mittels Massenspektrometrie und Immunoblots isolierter Spots das *T. gondii*-Homolog zum eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 4A identifiziert (2.1.2). *T. gondii* eIF4A ist stark homolog zu eIF4A Proteinen aus anderen Spezies. 69% der Aminosäure-Sequenz ist identisch mit der des murinen eIF4A. eIF4A ist der Prototyp einer Familie von DEAD-Box-Helikasen, in deren Aminosäure-Sequenz das Konsensusmotiv DEAD und sechs weitere hoch konservierte Regionen zu finden sind. Für diese Moleküle ist beschrieben, dass sie ATP-abhängig Sekundärstrukturen in RNA-Molekülen auflösen können (Übersicht in: Rogers, Jr. *et al.*, 2002). Die konservierten Domänen umfassen im *T. gondii* eIF4A 289 der 413 Aminosäuren. Die DEAD-Box (Region II) bildet den Teil eines ATPase B Motivs und liegt C-terminal zum A Motiv (AxxxxGKT, Region I), das die ATP Bindung kontrolliert. Die ATP-Hydrolyse und RNA-Bindung wird durch das HRIGRxxR Motiv (Region VI) vermittelt. Die Regionen Ia (PTRELA), III (SAT), IV (YCNT) und V (RGID) befinden sich im *T. gondii* eIF4A an den gleichen Positionen wie bei anderen eIF4A (Gastens und Fischer, 2002).

Obwohl eIF4A in der Zelle mit drei Molekülen pro Ribosom in einem zahlenmäßigen Überschuss zu den meisten anderen Initiationsfaktoren vorliegt, steht nur wenig

eIF4A für die Besetzung naszierender mRNAs zur Verfügung. Die eIF4A Moleküle sind in Zellen zu 80-90% an ribosomale 40S Untereinheiten gebunden, nur die restlichen Moleküle liegen im Zytoplasma ungebunden vor (Rogers, Jr. *et al.*, 2002). Diese Befunde erklären die Beobachtung, dass *T. gondii* eIF4A sowohl löslich als auch in der Membran-/Mikrosomenfraktion detektierbar ist (2.2.1). In der Membran-/Mikrosomenfraktion liegt eIF4A an Polysomen assoziiert vor und ist nach Triton X-114 Partitionierung in der wässrigen Phase zu finden.

Die Bedeutung von eIF4A für die Zelle scheint essentiell zu sein. *eIF4A*-defiziente Hefemutanten sind nicht lebensfähig (Linder und Slonimski, 1989). In Hefemutanten, bei denen konditional die eIF4A-Expression regulierbar ist, führt das Abschalten der eIF4A-Synthese zum Stopp der Proteinsynthese und damit zum Stillstand von Zellwachstum und Zellteilung (Daga und Jimenez, 1999). Die Abhängigkeit des Zellwachstums basiert dabei direkt auf der ATP-abhängigen RNA Helikasefunktion von eIF4A (Blum *et al.*, 1992). Mit Hilfe solcher eIF4A-Mutanten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Funktionalität des eIF4A-Proteins direkte Auswirkungen auf die Translationsrate hat (Schmid und Linder, 1991). Damit wirkt eIF4A über seine Funktion als essentielles Element der Translation entscheidend auf die Stoffwechsel- und Wachstumsrate (Galloni und Edgar, 1999).

Die auf Transkriptionsebene regulierte reduzierte Expression von eIF4A in Bradyzoiten im Vergleich zu Tachyzoiten (2.2.2) lässt sich als Folge oder als Ursache der metabolischen Unterschiede zwischen diesen beiden Stadien interpretieren. Bradyzoiten zeichnen sich im Vergleich zu Tachyzoiten durch ihre deutlich reduzierte Wachstumsrate aus. Die langsam wachsenden Bradyzoiten sind außerdem durch einen veränderten Energiestoffwechsel gekennzeichnet, bei dem der Hauptteil der Energie aus der Glycolyse gewonnen wird. Im Gegensatz dazu sind Citratzyklus und Atmungskette wahrscheinlich nicht vorhanden (Weiss und Kim, 2000). Derartig drastische Veränderungen haben vermutlich auch Auswirkungen auf die Proteinsynthese und Translation, um auch diese Stoffwechselwege in Bradyzoiten der Situation als Dauerstadium anzupassen. Welche übergeordneten Regulatoren auf Transkriptions- oder Translationsebene diese Veränderungen induzieren, ist bislang nicht bekannt (Weiss und Kim, 2000). Eine vergleichbare Situation wurde in einem anderen protozoischen Parasiten *Leishmania donovani* beobachtet, wo eine stadienabhängige Reduktion der Proteinsynthese mit der Reduktion der eIF4A-Expression einher geht (Bente *et al.*, 2002).

Ob die *T. gondii* eIF4A-Expression nur transkriptionell reguliert wird oder ob eIF4A autoregulatorisch seine eigene Expression und damit sogar vielleicht die Synthese weiterer Faktoren steuert, kann jedoch mit den gezeigten Daten nicht beurteilt werden. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass für mehrere Enzyme, wie z.B. die LDH1 und Glucose-6-Phosphat-Isomerase (G6P), die Translation ihrer Transkripte stadienspezifisch inhibiert ist (Tomavo, 2001). Beide Enzyme spielen eine Rolle in der Glycolyse, denn G6P katalysiert die Umsetzung von Glukose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat, welches anschließend zu Pyruvat umgewandelt werden kann und LDH1 katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat (Dzierszinski *et al.*, 1999; Yang und Parmley, 1995). In *T. gondii* wird demnach die stadienspezifische Expression von Schlüsselenzymen der Glycolyse translational reguliert. Es ist nicht auszuschließen, dass eIF4A an diesem Mechanismus direkt oder indirekt beteiligt ist.

3.2.2 Mögliche Wirkmechanismen des überexprimierten eIF4A

eIF4A wurde bei der vergleichenden Proteomanalyse von attenuierten und virulenten BK-Toxoplasmen als ein mit der Virulenz assoziiertes Protein identifiziert. Dass eIF4A tatsächlich ein Virulenzfaktor ist, wurde experimentell durch Überexpression des eIF4A in attenuierten BK-Toxoplasmen gezeigt. In diesem Kapitel soll diskutiert werden, welche Möglichkeiten vorstellbar sind, mit denen eIF4A als Virulenzfaktor wirken könnte.

Ein Charakteristikum vieler Virulenzfaktoren ist, dass diese Moleküle oft von der Immunabwehr des Wirts als Antigene erkannt werden. Solche Virulenz-Moleküle sind meistens auf der Oberfläche des Pathogens lokalisiert bzw. werden von ihm sekretiert (Wassenaar und Gaastra, 2001). Antigene, die während der Infektion durch das Immunsystem erkannt werden, bezeichnet man als „immundominant“. Bestandteile von partikulären Proteinkomplexen, die strukturell stark divergent von Wirtsmolekülen sind und kontinuierlich während der Infektion mit Immunzellen in Kontakt treten, sind sehr immunogene Faktoren. In diese Kategorie fallen bei *T. gondii* das Adhäsion SAG3 sowie das exkretierte ‚dense granule‘-Protein GRA2, die beide als Virulenzfaktoren beschrieben sind (Mercier *et al.*, 1998; Dzierszinski *et al.*, 2000). *T. gondii* eIF4A ist in der Maus kein immundominantes Antigen (2.3.1.2) und

wird vom Parasiten nicht sezerniert, sondern ist nur im Zytoplasma der Toxoplasmen nachweisbar (2.2.1). Falls dennoch eine Interaktion des Moleküls mit dem Immunsystem des Wirts stattfindet, kann dies erst nach Lyse des Parasiten erfolgen. Neben GRA2 und SAG3, die schon länger als Virulenzfaktoren beschrieben sind, wurden kürzlich zwei Faktoren in *T. gondii* identifiziert, die funktionell nicht den klassischen Virulenzfaktoren wie z.B. Adhärenzfaktoren oder Exo- und Endotoxinen zugeordnet werden können. Das membranständige Protein Myosin A wirkt ATP-abhängig als Motor der Gleitbewegung des Parasiten, besitzt also strukturelle und enzymatische Funktionen. Die Deletion des MyoA-Gens führt zu einer nahezu vollständigen Inhibition sämtlicher Gleitbewegungen von *T. gondii*-Tachyzoiten, die z.B. für die Invasion notwendig sind. Eine Virulenz der MyoA-defizienten Mutanten ist in der Maus nicht mehr messbar (Meissner *et al.*, 2002). Das zweite Protein, CPSII, ist ein Enzym im Pyrimidinstoffwechsel des Parasiten, das eine Schlüsselposition bei der Uracilsynthese in *T. gondii* innehat. CPSII-defiziente *T. gondii* Mutanten sind Uracil-auxotroph und können *in vitro* nur bei Zugabe von Uracil proliferieren (Fox und Bzik, 2002). Die Invasionsfähigkeit dieser Mutanten entspricht der des Wildtyps, nur die intrazelluläre Replikation ist ohne Zugabe von Uracil inhibiert. Auch diese Mutante ist nicht virulent in der Maus (Fox und Bzik, 2002). Die meisten der bisher identifizierten Virulenzfaktoren haben zwei Eigenschaften gemeinsam: erstens sind GRA2, SAG3, Myosin A und CPSII durch Gendeletionsanalysen identifiziert worden, und zweitens weisen die Deletionsmutanten (bis auf die GRA2⁻ Mutante) deutliche Defekte beim Wachstum *in vitro* auf. Diese Proteine entsprechen damit der Klasse von Virulenzfaktoren, die essentiell für die Adaptation des Pathogen an seinen Lebensraum Wirt sind (Wassenaar und Gaastra, 2001).

Die Proliferation von attenuierten BK-Toxoplasmen, deren Gehalt an eIF4A im Vergleich zu virulenten BK-Toxoplasmen reduziert ist (2.1.2), war relativ zu virulenten BK-Toxoplasmen *in vitro* nicht verlangsamt (Nischik *et al.*, 2001). Trotz reduzierter Virulenz in Mäusen wirkt sich also der Verlust an Virulenz bei den attenuierten BK-Toxoplasmen nicht negativ auf die Wachstumsrate *in vitro* aus. eIF4A ist folglich nicht als ‚life style‘-spezifisches Molekül einzuschätzen, sondern entweder als „echter“ Virulenzfaktor, der direkt die Krankheit im Wirt vermittelt, oder als Regulator anderer „echter“ Virulenzfaktoren. Demzufolge ist die Hypothese, dass eIF4A in seiner Eigenschaft als Translationsinitiationsfaktor den Metabolismus des Parasiten und damit den Infektionsverlauf im Wirt moduliert, sehr wahrscheinlich.

Der Gehalt an eIF4A in aBK-Tachyzoiten ist zwar relativ zu vBK-Tachyzoiten deutlich reduziert, doch die ungehemmte Proliferation von aBK-Tachyzoiten in der Fibroblastenkultur zeigt, dass dadurch globale Defekte der Proteinsynthese, wie sie für eIF4A-Mutanten von *Saccharomyces* beschrieben sind (Schmid und Linder, 1991), höchstwahrscheinlich nicht verursacht werden.

Bei den meisten Organismen finden sich zwei Gene für eIF4A, die sehr homolog zueinander sind (90-95%) (Rogers, Jr. *et al.*, 2002). Die mRNA Expression der Gene für eIF4AI bzw. eIF4AII wird in der Maus organspezifisch differentiell reguliert. Die eIF4AI mRNA ist in den meisten Geweben erheblich exprimiert, während die Expression von eIF4AII in Geweben mit geringer Zellproliferation stattfindet (Williams-Hill *et al.*, 1997). Ob die verstärkte Expression von eIF4AII in Niere und Hirn (Nielsen und Trachsel, 1988) zur Translation von verschiedenen Gruppen von mRNA Molekülen führt, ist bis jetzt noch nicht geklärt. Für evolutionär verwandte Organismen von *T. gondii* ist gezeigt, dass einige wie z.B. *Leishmania braziliensis* zwei eIF4A-Gene (Skeiky *et al.*, 1995) bzw. wie *Cryptosporidium parvum* zwei alternative Transkripte eines eIF4A-Gens besitzen (Spano und Crisanti, 2000). Im Southernblot mit verschiedenen Sonden wird jeweils nur ein DNA-Fragment markiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass im Genom von *T. gondii* nur ein einziges eIF4A-Gen (Richly, 2000) vorhanden ist. Ebenfalls sind in RT-PCR und Immunoblotanalysen keine alternativen Transkript- bzw. Proteinspezies detektierbar (Gastens und Fischer, 2002). Der Zusammenhang von eIF4A und Virulenz lässt sich demnach nicht durch Translation unterschiedlicher eIF4A-mRNA Spezies erklären und beruht auch nicht auf der Expression verschiedener eIF4A-Isoformen.

Dementsprechend muss die eIF4A-Wirkung als Virulenzfaktor auf quantitative Veränderungen seiner Expression zurückzuführen sein. Für das virulente *T. gondii*-Isolat vBK war ein beinahe 10fach höherer eIF4A-Gehalt in Tachyzoiten nachweisbar, und dieses Isolat zeigte auch die höchste Virulenz in der Maus. Die drastische Reduktion der eIF4A-Konzentration nach Attenuierung korreliert mit einer 1000fach reduzierten Virulenz (Nischik *et al.*, 2001) und bei Verdopplung der eIF4A-Expression in aBK-Überexpressionsmutanten steigt die Virulenz wieder an, wenn auch nicht bis auf das Niveau der vBK-Toxoplasmen (2.3.3). Die geringe Konzentration von eIF4A-Molekülen in attenuierten BK könnte für die Translation von einigen wenigen mRNAs nicht ausreichen. Es erscheint wahrscheinlich, dass die

Erhöhung der eIF4A-Konzentration durch die Überexpression in den schwach virulenten aBK-Toxoplasmen spezifisch die Synthese weniger Proteine verändert. Solche Proteine sind vielleicht die eigentlichen Faktoren, die die Virulenz beeinflussen. Ein Beispiel für derartige konzentrationsabhängige eIF4A-Wirkungen ist bei der Ontogenese des *Xenopus* Embryos beobachtet worden (Audet *et al.*, 1987). Die Überexpression von eIF4A in *Xenopus* Embryonen induziert die Expression spezifischer Marker der Neuralplatte (Morgan und Sargent, 1997). Auch während der unbeeinflussten Ontogenese ist eine abrupte eIF4A-Induktion beim Einsetzen der neuralen Entwicklung zu beobachten (Morgan und Sargent, 1997). Diese Daten lassen sich dahingehend interpretieren, dass eIF4A als Antwort auf die einsetzende Neuralentwicklung die Translation einer kritischen mRNA initiiert, deren Produkt die Expression Neuralplatten-spezifischen Marker aktiviert (Morgan und Sargent, 1997). Experimentell erstmals bewiesen wurde eine regulative Funktion von eIF4A von Daga und Jimenez (1999). Bei Hefemutanten war durch die eIF4A-Konzentration in den Zellen der Eintritt in die Zellteilung reguliert. Transkripte für die Zyklin-abhängige Kinasen (Cdc) 13 und 25 wurden nur bei ausreichender eIF4A-Konzentration translatiert. Deren Expression entscheidet dosisabhängig über den Eintritt der Zelle in die Mitose. Molekular gesehen spielt bei dieser Kontrolle die Helikaseaktivität von eIF4A wahrscheinlich die entscheidende Rolle, denn die 5'-untranslatierten Bereiche der Cdc25 und Cdc13 mRNAs sind ungewöhnlich lang und weisen mehrere stabile ‚hairpin loop‘-Motive (Poly-Uracilsequenzen) auf. Da die Abhängigkeit der Translation von eIF4A direkt proportional zur Stärke der Sekundärstrukturen im 5'-UTR der mRNAs ist, werden Transkripte wie *cdc25* und *cdc13* nur sehr ineffizient translatiert (Daga und Jimenez, 1999; Svitkin *et al.*, 2001).

Vergleichbare Mechanismen könnten in aBK-Toxoplasmen bzw. in der aBK^{LDH1+Myc}-Mutante die Expression von Virulenzfaktoren verhindern, die in vBK-Toxoplasmen translatiert werden. Um Faktoren zu identifizieren, die durch die eIF4A-Überexpression in aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen möglicherweise induziert werden, wurden aBK- und aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen mittels Proteomanalyse miteinander verglichen. In dieser Untersuchung war der Gehalt an GRA7 im Proteom von aBK^{eIF4A+Myc}-Tachyzoiten im Vergleich zu aBK-Tachyzoiten deutlich erhöht. Die Überexpression von eIF4A in aBK-Tachyzoiten induziert also indirekt oder direkt eine Anhebung der steady-state Synthese von GRA7 in den mutierten Tachyzoiten. Diese

Daten deuten darauf hin, dass vielleicht, ähnlich wie bei *Saccharomyces* beschrieben (Daga und Jimenez, 1999), auch in *T. gondii*-Tachyzoiten die intrazelluläre Konzentration von eIF4A kritisch ist für die Translation spezieller Proteine. Möglicherweise ist GRA7 ein derartiges Protein. In diesem Fall ist GRA7 ein Kandidat, über dessen Wirkung die Virulenz des eIF4A vermittelt werden könnte.

3.2.3 Die Infektion der Maus mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen

eIF4A wurde als erster Virulenzfaktor von *T. gondii* durch Überexpression in attenuierten Toxoplasmen identifiziert. Dieser Ansatz war notwendig, da eIF4A in allen bisher untersuchten Organismen als unentbehrlicher Faktor der Translationsinitiation beschrieben ist (Rogers, Jr. *et al.*, 2002). Die Erzeugung einer eIF4A-Deletionsmutante, wie für GRA7 beschrieben, (2.4.1) wäre vermutlich nicht erfolgreich gewesen, denn in Hefen führt eine Deletion des eIF4A-Gens zum Stopp der Translation und wirkt letal (Linder und Slonimski, 1989).

Eine experimentelle Infektion von Mäusen mit 100 aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen überlebten nur 20% der Tiere. Im Gegensatz dazu ist die Überlebensrate von Mäusen, die mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert wurden, mit fast 90% mehr als viermal höher (2.3.3). Die Mäuse erliegen der Infektion, wie für die intraperitoneale Infektion mit Gruppe I-Isolaten beschrieben (Sibley *et al.*, 2002), während der akuten Phase. Eine chronische Infektion konnte bei den Mäusen, die mit aBK-Mutanten infiziert wurden, nicht festgestellt werden. Die Reaktion des Immunsystems der Maus auf die Infektion scheint für die beiden aBK-Mutanten sehr ähnlich zu sein. Die Reaktion ist gekennzeichnet durch eine Induktion der proinflammatorischer Zytokine IL12 und IFN γ , deren Konzentrationen im Serum und in der Peritonealfüssigkeit über die Infektionsdauer ansteigen.

Dendritische Zellen sind die ersten Zellen, die innerhalb von sechs Stunden nach einer Stimulation durch Toxoplasma Proteine, *in vivo* IL12 produzieren (Sousa *et al.*, 1997; Aliberti *et al.*, 2003). Acht Stunden nach intraperitonealer Infektion mit Tachyzoiten wandern IL12-produzierende Granulozyten an den Infektionsort (Bliss *et al.*, 2000). Die fortschreitende Infektion lockt immer mehr IL12-produzierende Zellen, wie z.B. Makrophagen (James, 1995), in die Bauchhöhle. Dazu passt, dass die IL12-Konzentration in der Peritonealfüssigkeit bereits an Tag drei nach Infektion mit aBK-

Mutanten bei mehreren ng/ml lag, während bei uninfizierten Mäusen gar kein IL12 in der Bauchhöhle nachweisbar war (2.3.5.3). IL12 induziert in NK-Zellen die IFN γ Produktion und leitet die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu IFN γ -produzierenden T_H1-Zellen ein (Springer, 1990). Die Zunahme der IFN γ -Konzentration in Serum und in Peritoneum wurde sowohl bei der Infektion mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen als auch bei der Infektion mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen beobachtet. Die Produktion von IFN γ erfolgte zeitlich verzögert zur IL12-Produktion. Der Verlauf der Zytokininduktion ist typisch für *T. gondii* Infektionen und entspricht dem einer Zell-vermittelten Immunantwort (Lieberman und Hunter, 2002). Obwohl die Zytokine IL12 und IFN γ essentiell für die Abwehr einer *T. gondii* Infektion sind, weisen neue Arbeiten auf die paradoxe Tatsache hin, dass bei Mäusen, die mit dem Isolat RH infiziert worden sind, die Stimulation des Immunsystems durch die proinflammatorischen Zytokine IFN γ sowie IL12 und IL18 außer Kontrolle gerät (Gavrilescu und Denkers, 2001; Mordue *et al.*, 2001). In der Arbeit von Mordue *et al.* (2001) wurde im Serum von mit Stamm RH infizierten Mäusen am Tag acht nach Infektion über 300 ng/ml IFN γ nachgewiesen, während in dieser Arbeit bei der Infektion mit aBK^{eIF4A+Myc}- und aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen nur ca. 20 bis 40 ng/ml messbar waren (2.3.5.1). Im Gegensatz dazu lagen die Serumwerte für IL12 mit ca. 15 bis 30 ng/ml auf vergleichbarem Niveau. Mordue *et al.* wiesen weiterhin Leberschäden bei Mäusen, die mit Stamm RH-Toxoplasmen infiziert worden waren, nach. Die Schädigung der Leber äußerte sich in erhöhten Werten für Alanin- und Asparagintransaminasen im Serum. Solche Unterschiede ließen sich jedoch in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich der Seren von beiden aBK-Mutanten nicht finden, obwohl prinzipiell beide Enzyme unter der Infektion verstärkt freigesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

Ein Zytokinschock mit Leber- und Milzschädigung als Todesursache der Mäuse, die mit aBK^{eIF4A+Myc}- bzw. aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert wurden, lässt sich an Hand der Konzentrationen der Zytokine und Leberenzyme im Serum bislang nicht belegen. Vielmehr weisen die Infektionsraten der intraperitonealen Leukozyten darauf hin, dass das Immunsystem der Maus den Parasit in der Bauchhöhle nicht mehr kontrollieren kann. Es fällt auf, dass die Infektionsrate der Leukozyten acht Tage nach Infektion für Mäuse, die mit RH-Toxoplasmen infiziert wurden, mit 0,2% (Mordue *et al.*, 2001) fast 300fach unter der Infektionsrate liegt, die bei Mäusen gemessen wurde, welche mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren. Die Differenz ist umso überraschender, als dass die Infektion mit RH-Toxoplasmen trotz

der geringen Parasitenlast in der Bauchhöhle zu 100% letal ist, während die Infektion für 20% der Mäuse, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren, nicht letal verlief. Diese Daten bestätigen die Befunde die bereits von Nischik *et al.* (2001) beim Vergleich der Infektion von Mäusen mit aBK- und vBK-Toxoplasmen gemacht wurden: fünf Tage nach Infektion ließen sich nach Spülung der Bauchhöhle von Mäusen, die mit vBK-Toxoplasmen infiziert worden waren, keine intakten Zellen sondern nur noch extrazelluläre Toxoplasmen isolieren. Dieser Befund deutet ebenfalls auf eine unkontrollierte Vermehrung der virulenten Toxoplasmen in der Bauchhöhle der Mäuse hin. aBK^{eIF4A+Myc}- und aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen wiesen *in vitro* vergleichbare Wachstumsraten auf. Es ließen sich aber im Peritoneum von Mäusen, die mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren, signifikant weniger infizierte Zellen nachweisen als in Mäusen, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren (2.3.5.2). Die Infektionsrate der intraperitonealen Leukozyten wurde bereits von Nischik *et al.* (2001) als Parameter identifiziert, in dem sich die Infektion der Maus mit attenuierten bzw. virulenten BK-Toxoplasmen unterscheidet. Am Tag drei nach Infektion ist die Anzahl der infizierten Leukozyten bei Mäusen, die mit vBK-Toxoplasmen infiziert wurden fast 30fach höher als bei Mäusen, die mit aBK-Toxoplasmen infiziert wurden. In Mäusen, die mit vBK- bzw. aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert wurden, findet also eine unkontrollierte Vermehrung des Parasiten in der Bauchhöhle statt. Eine lokale Vermehrung von *T. gondii* in der Bauchhöhle führt zu einer schweren Peritonitis, und solche Entzündungen sind wahrscheinlich für infizierte Mäuse tödlich (Tato *et al.*, 2003).

In den Gehirnen von Mäusen, die mit aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren, ließen sich nach überstandener Krankheit, d.h. vier Wochen nach Infektion, weder Zysten noch Tachyzoiten mikroskopisch nachweisen. Um einzelne extrazelluläre Tachy- oder Bradyzoiten nachzuweisen, wurden parallel Plaque-Assays durchgeführt, bei denen allerdings ebenfalls keine Toxoplasmen nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt). Wie nach einer Infektion mit aBK-Toxoplasmen scheint das Immunsystem der Maus aBK^{LDH1+Myc}-Toxoplasmen zu eliminieren, ohne dass eine chronische Infektion mit Gehirnzysten nachweisbar ist (Nischik *et al.*, 2001). Damit übereinstimmend war die Konzentration von IL12 im Serum der überlebenden Mäuse 30 Tage nach Infektion mit ca. 4,5 ng/ml nur leicht erhöht im Vergleich zu uninfizierten Mäusen, während die Serumkonzentration von

IFN γ wieder unter der Nachweisgrenze lag. Diese Daten lassen sich so interpretieren, dass wie bei Mäusen, die eine Infektion mit aBK-Toxoplasmen überstanden haben, die Produktion von Entzündungsmediatoren abgeschaltet wird.

Die ähnliche Reaktion des Immunsystems der Maus auf die Infektion mit den aBK-Mutanten und die signifikant erhöhte Parasitenlast in der Bauchhöhle der Mäuse, die mit aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen infiziert worden waren, sprechen für einen neuen Virulenzmechanismus. Der Virulenzmechanismus von aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen scheint primär im lokalen Überwinden der Wirtsimmunantwort und weniger in einer Zytokin-induzierten Schädigung zu liegen, wie es für den Stamm RH beschrieben ist (Mordue *et al.*, 2001; Gavrilescu und Denkers, 2001). Prinzipiell deuten solche Unterschiede darauf hin, dass trotz starker genetischer Homogenität zwischen den einzelnen Isolaten von *T. gondii* je nach Isolat andere Virulenzstrategien zur Ausprägung kommen. Während der RH-Stamm seine Virulenz in der Maus offensichtlich durch eine fehlgeleitete Zytokinproduktion induziert, scheinen die in dieser Arbeit untersuchten virulenten Toxoplasmen des Stamm BK die Immunabwehr der Maus durch unkontrolliertes Wachstum in der Bauchhöhle zu durchbrechen.

3.3 GRA7 ist kein Virulenzfaktor sondern die Stärke seiner Expression ist ein Indikator für *T. gondii*-Virulenz

GRA7 ist Mitglied der Familie von GRA-Proteinen, die nur über ihre Lokalisation in den elektronendichten ‚dense granules‘ der Apicomplexa und nicht über funktionelle oder strukturelle Gemeinsamkeiten der Moleküle definiert wurden (Carruthers, 1999). GRA7 wurde als Virulenz-assoziiertes Protein identifiziert (Nischik *et al.*, 2001; diese Arbeit), denn es wird in virulenten *T. gondii* Stämmen wie z.B. vBK, S23 und aBK^{eIF4A+Myc} verstärkt exprimiert. In der vergleichenden Proteomanalyse von S23- mit S22-Toxoplasmen sowie von vBK- bzw. aBK^{eIF4A+Myc}- mit aBK-Toxoplasmen wurde unabhängig voneinander eine Korrelation zwischen der Expression von GRA7 und der Virulenz in der Maus entdeckt. GRA7 ist weiterhin als einziges GRA Protein in allen infektiösen Stadien (Tachyzoit, Bradyzoit, Merozoit und Sporozoit) exprimiert und nimmt damit eine besondere Stellung unter den ‚dense granule‘ Proteinen ein

(Ferguson *et al.*, 1999). Das GRA Protein GRA2 wurde von Mercier *et al.* (1998) als erster Virulenzfaktor von *T. gondii* identifiziert. *GRA2*-defiziente Mutanten des Stamms RH zeigen eine um 30% reduzierte Virulenz in der Maus und entwickeln zystenartige Strukturen, wie man sie in der chronischen Phase der Infektion mit Toxoplasmen der Gruppe II und III findet.

Prinzipiell boten sich zur Untersuchung der Virulenzassoziation von GRA7 einerseits die Überexpression des Proteins in nicht-virulenten Toxoplasmen oder andererseits die Deletion des GRA7-Gens in einem virulenten Stamm an. Im Gegensatz zur Situation bei eIF4A, wo alle Daten der Literatur für eine essentielle Funktion von eIF4A sprechen, ist die Deletion von GRA-Genen bei allen bisherigen Untersuchungen nicht letal (Mercier *et al.*, 1998; 2001; 2002; diese Arbeit).

Für GRA7 wurde, wie beschrieben, aus dem *hxgprrt*-defizienten Stamm RH eine um den GRA7 ORF deletierte Mutante (Δ GRA7) generiert (2.4.1). Die GRA7-Deletionsmutante unterscheidet sich rein optisch nicht vom Ausgangsstamm und auch die Proliferation *in vitro* ist unverändert. Auch Mutanten, denen das Gen für GRA2 oder GRA4 oder GRA5 oder GRA6 deletiert wurde, proliferieren *in vitro* vergleichbar, was darauf hindeutet, dass GRA-Proteine zumindest in der Zellkultur kein begrenzender Faktor der intrazellulären Entwicklung von *T. gondii* sind (Mercier *et al.*, 2002). Die Beeinflussung der Virulenz durch GRA7 wurde durch Infektion von Mäusen mit der Δ GRA7-Mutante bzw. mit dem *GRA7*⁺-Wildtypstamm geprüft. Hier ergaben sich bei der intraperitonealen Infektion mit 100 Tachyzoiten keine signifikanten Unterschiede zwischen *GRA7*-defizienter Mutante und Wildtyp. Auch bei einer Infektionsdosis von nur zehn Tachyzoiten verlief die Infektion für Mäuse, die mit Wildtyp oder Deletionsmutante infiziert worden waren, zu 100% letal. Der hochvirulente Phänotyp der RH-Toxoplasmen ließ sich durch Deletion des GRA7-Gens nicht aufheben und auch die Komplementation der Δ GRA7-Mutante durch Transfektion eines plasmidkodierten GRA7 ORF's veränderte die Virulenz nicht (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass GRA7 im RH Stamm, wie für die zwei anderen GRA-Proteine GRA5 und GRA6 gezeigt (Mercier *et al.*, 2001 und 2002), kein essentieller Virulenzfaktor ist.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie die Virulenz-assoziierte Expression des GRA7 in zwei verschiedenen Toxoplasma-Stämmen zu erklären ist. Dazu bieten sich zwei verschiedene Hypothesen an: erstens erfolgte die Deletion des GRA7 Gens im gut untersuchten Stamm RH, in dem bislang alle Gendeletionen durchgeführt wurden,

und nicht in den Stämmen, in denen die Virulenz-Assoziation gefunden wurde. S22 und S23 sind Nachkommen der Kreuzung eines Stammes der Gruppe II mit einem Stamm der Gruppe III und ihr Genotyp weist Marker aus beiden Stammgruppen auf (Grigg *et al.*, 2001). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass diese Stämme aus ihrem andersartigen Allelrepertoire auf andere Virulenzfaktoren zurückgreifen als Parasiten des Stammes RH. Die *T. gondii* Stämme BK und RH gehören beide zur virulenten Stammgruppe I (Sibley und Boothroyd, 1992). Offensichtlich unterscheiden sich beide Stämme jedoch trotzdem deutlich voneinander. Der Stamm BK konvertiert durch Langzeitpassage *in vitro* zur attenuierten Variante aBK (Nischik *et al.*, 2001), während der Stamm RH auch nach über 30 Jahren *in vitro* Kultivierung hochvirulent in Mäusen ist (Su *et al.*, 2003). Es ist weiterhin zu berücksichtigen, dass auch der Infektionsverlauf, wie in 3.2.3 diskutiert und von Nischik *et al.* (2001) beschrieben, zwischen RH und BK nicht identisch ist. Um zu prüfen, ob die Hypothese von unterschiedlichen Virulenzfaktoren in verschiedenen Stämmen korrekt ist, muss in weiteren Untersuchungen kontrolliert werden, ob eine *GRA7*-defiziente BK-Mutante im Gegensatz zur *GRA7*-defizienten RH-Mutante an Virulenz verliert.

Die zweite, wahrscheinlichere Hypothese ist, dass *GRA7* zwar kein Faktor ist, der direkt an der Virulenz beteiligt ist, sondern dass *GRA7* vielmehr als eine Art Indikatormolekül anzusehen ist. Es ist vorstellbar, dass die Expression von *GRA7* zusammen mit den eigentlichen Virulenzfaktoren reguliert wird. Hinweise dafür gibt die Analyse der Promotoren verschiedener *GRA*-Gene, die alle ein Konsensusmotiv gemeinsam haben und deren Expression in Tachyzoiten synchron abläuft (Mercier *et al.*, 1996). Ebenso könnte die erhöhte *GRA7* Expression und die der unbekanntenen Virulenzproteine translational reguliert sein. Dafür spricht, wie schon diskutiert (3.2.3), die verstärkte *GRA7* Expression in aBK-Toxoplasmen nach eIF4A-Überexpression.

Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren, mit eIF4A, eIF5A2 und p40/LRP sowie dem *GRA7*, Proteine, die mit der Virulenz von *T. gondii* assoziiert sind. Die Überexpression von eIF4A in attenuierten BK-Toxoplasmen erhöht die Virulenz in der Maus deutlich. Auf molekularer Ebene führt die eIF4A-Überexpression dazu, dass der *GRA7*-Gehalt in aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen anwächst. Welcher Mechanismus einerseits die Zunahme der *GRA7*-Konzentration und andererseits die

erhöhte Virulenz in der Maus verursacht ist noch unklar. In Untersuchungen, bei denen mit Ribosomen beladene Transkripte aus aBK-, vBK- und aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen in Saccharose-Gradienten fraktioniert werden, ist zu klären, ob in aBK-Toxoplasmen die Initiation der Translation beeinträchtigt ist. Falls sich diese Annahme bestätigt, können, wie bei *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben (Daga und Jimenez, 1999), Fraktionen isoliert werden, in denen die Transkripte nur mit einzelnen Ribosomen beladen sind. Bei solchen mRNA-Molekülen läuft die Initiation der Translation nur ineffizient ab. Transkripte, die zwar in Fraktionen aus vBK- und aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen nicht aber in aBK-Toxoplasmen detektiert werden, kodieren vermutlich für Proteine, deren Expression translational gehemmt ist. Es könnte sein, dass solche Proteine die Virulenz von aBK^{eIF4A+Myc}-Toxoplasmen bestimmen.

4 Material

4.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad *pro analysis*. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Wasser (Hausanlage Millipore GmbH, Schwalbach) verwendet, hier nachfolgend als *aqua dest.* bezeichnet.

4.2 Plasmide

pGEM-T	Promega, Madison, USA
pET29a	Novagen, Bad Soden
pTub1CAT	freundliche Gabe von Wolfgang Bohne, Göttingen
pTub+Myc	freundliche Gabe von Boris Striepen, Athens, USA
pLDH1+Myc	diese Arbeit
peIF4A+Myc	diese Arbeit
p5'Dral	diese Arbeit
p3'Stul	diese Arbeit
pGRA7KO	diese Arbeit

4.3 Proteine

4.3.1 Antikörper

anti-c-myc	Oncogene, Cambridge, UK
anti-eIF4A ¹⁻¹⁵	Eurogentec, Belgien
anti-mu-IFN γ -unmarkiert/-biotinyliert	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
anti-mu-IL12-unmarkiert/-biotinyliert	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg
anti- <i>T.g.</i> GRA7 (5-241-178)	Bonhomme <i>et al.</i> (1998)
anti- <i>T.g.</i> GRA7 (BATO 214)	Jacobs <i>et al.</i> (1998)

anti- <i>T.g.</i> -4F8	Fischer <i>et al.</i> (1997)
anti- <i>T.g.</i> -LDH1	Reichmann <i>et al.</i> (2001)
anti- <i>T.g.</i> -ROP9	Reichmann <i>et al.</i> (2002)
anti- <i>T.g.</i> -SAG1	Innogenetics, Gent, Belgien
anti- <i>T.g.</i> -Serum	Innogenetics, Gent, Belgien
anti- <i>T.g.</i> - β -Aktin	Ding <i>et al.</i> (2000)
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg

4.3.2 Zytokine

r-mu-Interleukin12	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
r-mu-Interferon- γ	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg

4.3.3 Restriktionsenzyme

<i>Apal</i>	Promega, Madison, USA
<i>AvrII</i>	NEB, Beverly, USA
<i>BamHI</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>BglII</i>	NEB, Beverly, USA
<i>DraI</i>	Clontech, San Diego, USA
<i>EcoRI</i>	Promega, Madison, USA
<i>HindIII</i>	Promega, Madison, USA
<i>SpeI</i>	NEB, Beverly, USA
<i>StuI</i>	Clontech, San Diego, USA
<i>XhoI</i>	Promega, Madison, USA

4.3.4 Sonstige Enzyme

DNase I	Roche, Mannheim
Expand-High-Fidelity-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim

Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma, St. Louis, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
Shrimp alkalische-Phosphatase	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim
Trypsin	Roche, Mannheim

4.4 Nukleinsäuren, Desoxyoligonukleotide und Nukleotide

Nukleinsäuren

kb-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
<i>cat</i> -Sonde	diese Arbeit
<i>gra7</i> -Sonde	diese Arbeit

Desoxyoligonukleotide

5' G3PDH:	5' TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC 3'
3' G3PDH:	5' CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'
5' SAG1:	5' GCC GTT GTG CAG CTT TCC GTT CTT C 3'
3' SAG1:	5' ATC CCC CGT CAC CCA GCT ATC TTC T 3'
5' BAG1:	5' GTT CCA TCC CGC GGG GCC TCA CTC 3'
3' BAG1:	5' CGG CGC GCA AAA TAA CCG GAC ACT CG 3'
5' B1	3' TGT GCT AAA GGC GTC ATT GCT GTT
3' B1	3' CTT GTG GGG GCG GAC CTC TCT TG
gap-o	5' AGC TTT AAC GTT TTG TAT TAA AAG GGA TTA CTG CGG CGT CTC ATT TCC AAA ATG CA 3'
gap-u	5' AAA ACC TTT ACT CTG CGG CGT CAT TAG GGA AAA TTA TGT TTT GCA ATT 3'
5' BamHleIFAEEx	5' AAC GGA TCC AAA ATG GAG AAC AAC GAA GAT AAA CAA C 3'
3' Avr2elF4AEx	5' GAC CCT AGG GAA GAA CTC CGC GAC TTC CAT G 3'
5' Bgl2LDH1Ex	5' ATC AGA TCT AAA ATG GCA CCC GCA CTT GTG CAG 3'

3' Avr2LDH1Ex	5' TCT CCT AGG CGC CTG AAG AGC AGC AAC CG 3'
5' ToifPCR	5' GTG TGA ATT CAT GGA GAA CAA CGA AGA TAA ACA AC 3'
3' Toif-PCR	5' GTG TGA ATT CCT AGA AGA ACT CCG CGA CTT CC 3'
AP1	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'
GSP1A	5' GTA TTA AAA GGG ATT ACT GCG GCG TCT CAT 3'
GSP2B	5' GCA CTC GAG CAA GAG GTG CCT GAA TC 3'
AP2	5' ACT ATA GGG CAC GCG TGG T 3'
GSP1B	5' GATTGAAGTACCCTATATTGGGGCTTGC 3'
5' ApaI GRA7KO	5' TGC TGA GGG CCC ACT ATA GGG CAC GCG TGG T 3'
3' HindIII GRA7KO	5' ATC TGA AAG CTT GCA AGC CCC AAT ATA GGG TAC TTC AAT C 3'
5' GSP2B+SpeI	5' TGC TGA ACT AGT TGC ACT CGA GCA AGA GGT GCC TGA ATC 3'
3' AP1+NotI	5' TGC TGA GCG GCC GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC 3'
5' eIF4A	5' CCA CAG GAC ATT TTG GAG CTG AC 3'
3' eIF4A	5' TCG CGC ATA ATC ATC TCA CGA C 3'
5' β -Tub	5' CCC GTT CCC TCG TCT CC 3'
3' β -Tub	5' CTC GGT GAA TTC CAT CTC GT 3'

Nukleotide

[5,6- ³ H] Uracil	Amersham Pharmacia, Freiburg
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5' [α ³² P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim

4.5 Medien und Puffer

20x SSC	0,3 M Natriumcitrat, pH 7.0 3 M Natriumchlorid
Blocklösung	0,1 g/ml Blockreagenz (Roche) in 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl pH 7,5 BioWhittaker, Verviers, Belgien
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) + 25 mM HEPES, ohne Glutamin	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.3	Serag Wiessner, Naila
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl, pH 7 89 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA
Zell-Medium	IMDM+ 1% (v/v) Glutamin 5% (v/v) FCS 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol

4.6 Feinchemikalien

(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) IPTG	ICN, Costa Mesa, USA
β -Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma, St. Louis, USA
4',6-diamino-2-phenylindole-dihydrochlorid-hydrate (DAPI)	Boehringer, Mannheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Biozym, Hameln
Ammoniumoxalat	Sigma, St. Louis, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Borsäure	Merck, Darmstadt

Bovine Serum Albumine, cell culture tested	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	ICN, Aurora, USA
CHAPS	Fluka, Buchs, CH
Chloramphenicol	Sigma, St. Louis, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Blue G	Sigma, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Diethylether	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	apbiotech, Freiburg
Ethanol 97%	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA), cell culture tested	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll Typ 400	apbiotech, Freiburg
Fluoromount-G	SBA, Birmingham, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Cytogen, Princeton, USA
Glutamin (200 mM)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Gluthation	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinium-Isothiocyanat (GSCN)	Sigma, St. Louis, USA
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, St. Louis, USA
Imidazol	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt

Kristallviolett	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Gibco BRL, Eggenstein
LB-Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Oxoid, Basingstoke, GB
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine	Sigma, St. Louis, USA
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
n-Butanol	Merck, Darmstadt
N-Laurylsarkosin	Sigma, St. Louis, USA
Parafinöl	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, St. Louis, USA
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, St. Louis, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Thioglykolat	Sigma, St. Louis, USA
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA
Triton X-114	Sigma, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% w/v)	Biochrom, Berlin
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Zinksulfat	Sigma, St. Louis, USA

4.7 Sonstige Materialien und Geräte

Basic-96-Harvester (Zellerntegerät)	Zinser analytic Skatron, Frankfurt
BetaPlate Scint (Szintillationsflüssigkeit)	LKB Wallac, FIN
CO ₂ -begaster Brutschrank (Heraeus B 5060 EK/CO ₂)	Heraeus, Hanau
ELISA-Photometer	Tecan
Nylonmembran Hybond N+	apbiotech, Freiburg
Glasfaserfilter (Preprint Filtermat)	LKB Wallac, FIN
Kodak X-OMAT, AR Film, XAR-5	Kodak, Rochester, USA
Nitrozellulosemembran ‚Protran‘ 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A)	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
1205 Betaplate (Szintillationszähler)	LKB Wallac, FIN
Multiphor II (2D- Elektrophoresekammer)	Amersham Bioscience, Freiburg
96-well Immunoplate Maxisorp F96	Nunc, Wiesbaden
Röntgenfilme X-OMAT	Kodak, New York, USA
3 µm-Filter	Millipore, Schwalbach

4.8 Organismen

4.8.1 Mausstämme

BALB/c	Tierversuchsanlage Düsseldorf
NMRI	Tierversuchsanlage Düsseldorf

4.8.2 Zelllinien

L929 (Sanford <i>et al.</i> , 1948)	ATCC, Manassas, USA
HS27 (Suss-Toby <i>et al.</i> , 1996)	ATCC, Manassas, USA

4.8.3 *Toxoplasma gondii* Stämme

BK (Winser <i>et al.</i> , 1948)	Institut für Medizinische Pathologie, Bonn
aBK (Nischik <i>et al.</i> , 2001)	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf
aBK ^{elF4A+Myc}	diese Arbeit
aBK ^{LDH1+Myc}	diese Arbeit
DX (Schlüter <i>et al.</i> , 1991)	Institut für Medizinische Pathologie, Bonn
RH (Sabin, 1941)	ATCC, Manassas, USA
RH <i>hxgprt</i> (Donald <i>et al.</i> , 1996)	ATCC, Manassas, USA
RH <i>hxgprt gra7</i> (Δ GRA7)	diese Arbeit

4.8.4 Bakterien

XL1blue	<i>endA1 hsdR17</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) <i>supE44 thi-1</i> <i>recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15::Tn10(Tc ^R)]	Stratagene, Amster- dam, Niederlande
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)	Novagen, Bad Soden

5 Methoden

5.1 Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme BALB/c und NMRI wurden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf unter spezifiziert Pathogen-freien Bedingungen gezüchtet. Für experimentelle Parasiten-Infektionen wurden acht bis zwölf Wochen alte Tiere verwendet. Kurz vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch Genickbruch oder in CO₂-gesättigter Atmosphäre getötet und die Organe unter sterilen Bedingungen entnommen

5.1.1 Serumgewinnung

Zur Gewinnung von Mausseren wurden Mäuse für ca. ein bis zwei Minuten mit Diethylether betäubt und bei fortlaufender Etherinhalation wurde der narkotisierten Maus der Brustkorb geöffnet. Nach Durchtrennung von Sternum und Rippenbögen ohne Zwerchfellverletzung wurde das schlagende Herz mit einer 22 *gauge* Kanüle punktiert und ca. 400 bis 1000 µl Blut in eine 2 ml Spritze gesogen. Das Blut wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30 min bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Der agglutinierte Blutkuchen wurde anschließend für 15 min bei 12000 x g, 4°C zentrifugiert und der Serumüberstand vorsichtig abgenommen. Nach nochmaliger Zentrifugation des Überstands für 15 min bei 12000 x g, 4°C wurde das Serum abgenommen und für die weitere Verwendung aliquotiert bei -70°C gelagert.

5.1.2 Präparation von Peritoneal-Exsudatzellen

Die getötete Maus wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und auf dem Rücken fixiert. Ohne Verletzung des Peritoneums wurde die Bauchwand eröffnet und gleichfalls mit 70% Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Bauchhöhle mehrfach mit 10 ml eiskaltem PBS durchspült, die Exsudat-Zellen wurden für zehn Minuten bei 4°C mit 300 x g abzentrifugiert und in PBS zum Zählen aufgenommen.

5.1.3 Zytospins

Zur *ex vivo* Analyse der Infiziertheit von Milzzellen und Peritonealexsudatzellen während der *T. gondii* Infektion der Maus wurden Zytospinpräparate hergestellt. Hierzu wurden jeweils 30000 Zellen in 200 µl PBS mit 10 min 1200 rpm (Cytospin 3, Shandon) auf Objektträger (Cytoträger, Shandon) geschleudert.

5.1.4 Virulenzanalyse

Zum Vergleich der Virulenz wurden Gruppen von acht bis zwölf Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen mit 10 bis 100 Tachyzoiten/Maus infiziert und der Zeitpunkt des Todes aufgezeichnet. Überlebende Mäuse wurden über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen beobachtet. Die tatsächliche Infektion der überlebenden Tiere wurde durch den Nachweis *T.gondii*-spezifischer Antikörper mittels ELISA (5.7.4) verifiziert.

5.2 Zellkulturmethoden

Alle Kulturen wurden bei 37°C in einem Brutschrank in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 10% (v/v) CO₂ kultiviert. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilwerkbank unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Zellkulturabfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert.

Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, 2 bis 3 bar) autoklaviert. Temperaturinstabile Lösungen wurden mit Hilfe einer 0,2 µm Membran („Bottle top filter“, Schleicher & Schüll, Dassel) steril filtriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210 °C hitzesterilisiert.

Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden mit fünf bzw. zehn Prozent fötalem Kälberserum supplementiert, das vor Verwendung für 30 min auf 56°C erhitzt wurde, um Komplementproteine zu inaktivieren.

Für die Sicherung der Zelllinien wurden ca. 10⁷ Zellen in 1000 µl FCS/10% DMSO aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.3 Kultivierung und Sicherung von Zelllinien

5.3.1 L929 Fibroblasten

Die schnell wachsende murine Fibroblastenlinie L929 diente als Wirtszelle für *T. gondii* Tachyzoiten (Gruppe I-Isolate RH und BK). Je 3×10^6 L929-Zellen wurden in Zell-Medium in Zellkulturflaschen mit 75 cm^2 Grundfläche kultiviert. Die Zellernte erfolgte mechanisch nach 3 bis 4 Tagen mit einem Zellschaber. Die geernteten Zellen wurden für zehn Minuten bei 4°C mit $300 \times g$ abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und in einer Neubauerkammer gezählt.

5.3.2 HS27 Fibroblasten

Die humane Fibroblastenlinie HS27 wächst stark adhärent und bildet stabile Monolayer aus. Zum Ernten wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Mit 10 ml Zell-Medium wurde die Flasche ausgespült und die Zellen bei $300 \times g$ für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Zur Expansion der Kultur wurden die geernteten Zellen 1:3 verdünnt in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden bis zur 32. Passage kultiviert. HS27 dienten als Wirtszelle für Tachyzoiten und Bradyzoiten des DX-Stammes und für Tachyzoiten der RH und BK Isolate.

5.4 Toxoplasmen

5.4.1 *In vitro* Kultivierung und Sicherung

T. gondii-Isolate der Stammgruppe I, die in Zellkultur nur Tachyzoiten ausbilden (z.B. der Stamm BK und RH, sowie deren Derivate) wurden in L929 (5.3.1) Zellen kultiviert. Bei einem Parasit/Wirtzell-Verhältnis von 5:1 waren alle Wirtszellen zwei bis drei Tage nach der Infektion lysiert. Extrazelluläre Toxoplasmen wurden abgespült und mit Hilfe einer differentiellen Zentrifugation von den übrigen Wirtszellbestandteilen getrennt. Der erste Zentrifugationsschritt wurde bei $50 \times g$ für fünf Minuten (Sedimentation von Wirtszellbestandteilen) und der zweite bei $600 \times g$ für 15 min (Sedimentation der Toxoplasmen) durchgeführt. Für die Weiterkultivierung

wurden die Wirtszellen fünffach infiziert. Für die Präparation von Toxoplasma-Lysat wurden die Toxoplasmen zweimal mit PBS gewaschen (15 min, 600 x g, 4 °C) und das Pellet bei -70°C gelagert.

Für die Sicherung der Toxoplasmalinien wurden ca. 3×10^7 Zellen in 250 µl eiskaltem Zellmedium ohne FCS aufgenommen und diese Suspension mit 250 µl eiskaltem Einfriermedium (Zellmedium plus 25% DMSO und 20% FCS) vermischt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

T. gondii DX-Tachyzoiten der Stammgruppe II wurden in HS27 Fibroblasten kultiviert. Konfluente Wirtszellkulturen wurden mit einem bis zehn Tachyzoiten pro Zelle infiziert. Innerhalb der nächsten sieben Tage wurden von den bereits lysierten Wirtszellen, teilweise mehrfach, extrazelluläre Tachyzoiten wie beschrieben geerntet.

5.4.2 Gewinnung von Hirnzysten

Zur Gewinnung von DX-Hirnzysten wurden adulte NMRI-Mäuse mit drei bis fünf lysierten Zysten in 100 µl PBS intraperitoneal infiziert. Frühestens vier Wochen nach Infektion wurden die Tiere getötet und die Hirne präpariert. Nach mechanischer Zerkleinerung des Gehirns wurden die Gewebesuspension in 15 ml PBS aufgenommen, mit 10 ml Ficoll Typ 400 unterschichtet und zentrifugiert (30 min, 800 x g, 4°C, ungebremst). Die im Sediment angereicherten Zysten wurden gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Aus einer Maus wurden etwa vier Wochen nach Infektion durchschnittlich 1000 Zysten gewonnen. Zur Reinfektion von Mäusen wurden die Zysten mit Trypsin/EDTA bei Raumtemperatur unter mikroskopischer Beobachtung lysiert. Sobald 90% der Zysten lysiert waren, wurde mit 300 µl FCS die Reaktion gestoppt und die Bradyzoiten in Zellmedium gewaschen (15 min, 1500 x g, RT). Durchschnittlich wurden pro Zyste 500 bis 1000 Bradyzoiten gewonnen.

5.4.3 Toxoplasmen-Proliferationstest

Die intrazelluläre Proliferation der Toxoplasmen kann entweder mit Hilfe der mikroskopischen Auszählung oder über den Einbau von ^3H -Uracil untersucht werden.

³H-Uracil Einbau: Toxoplasmen können aufgrund der erhöhten Aktivität der Uridin Phosphorylase sehr gut externes Uracil für die Nucleotidsynthese verwenden. Im Vergleich zur Wirtszelle ist die Aktivität dieses Enzyms 100fach stärker (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977).

Zur Messung der Toxoplasma-Proliferation wurden 2×10^4 bzw. 2×10^5 Wirtszellen (HS27 bzw. PECs) pro 96iger well in 200 μ l Medium ausgesät. Diese Zellen wurden in verschiedenen Infektionsdosen mit Toxoplasma infiziert. Nach drei Stunden wurde jeweils ein Ansatz mit 37 kBq pro well ³H-Uracil markiert und nach insgesamt 24 oder 48 Stunden wurde der Testansatz bei -20°C gestoppt. Durch den Einfriervorgang wurden die Zellen zerstört und die Nukleinsäuren freigesetzt. Der Inhalt der 96-well-Platten wurde mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf einen Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) übertragen. Der Filter wurde ca. zehn Minuten bei 100°C in einem Trockenschrank getrocknet und anschließend, nach Zugabe von ca. 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac), in Plastikfolie eingeschweißt. Die Messung erfolgte in einem ‚Beta-counter‘. Die Summe der pro Ansatz bestimmten Zerfälle pro Minute (cpm) gilt als Maß für die Stärke der Proliferation der Toxoplasmen. Für jede Versuchsbedingung wurden mindestens zwei Parallelansätze angesetzt. Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm ‚Prism 3.0‘ (Graph Pad Software, San Diego, USA).

5.4.4 Plaque-Assay

Zur Klärung der Frage welcher Prozentsatz der Toxoplasmen tatsächlich infektiös ist wurde ein Lysetest durchgeführt (Roos *et al.*, 1994). Dieser Assay wurde in HS27 Fibroblasten durchgeführt, da diese eine sehr geringe Wachstumsrate besitzen. In 25 cm^2 Zellkulturflaschen wurden die Zellen mit maximal 200 Toxoplasmen pro Flasche infiziert. Die infizierten Zellen wurden für acht bis 24 Stunden zum Äquilibrieren in den Brutschrank gestellt. Danach wurden die Flaschen verschlossen und für acht bis neun weitere Tage bei 37°C inkubiert ohne die Flaschen zu bewegen. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen mit PBS gespült und für fünf Minuten bei RT mit Ethanol fixiert. Die Färbung erfolgte für ca. zwei Minuten mit Kristallviolett. Danach wurde der violett gefärbte Zellrasen mit PBS gespült und an der Luft getrocknet. Im violett gefärbten HS27 Monolayer lassen sich nun durch infektiöse Toxoplasmen

verursachte Lysehöfe erkennen. Die Zahl der so genannten ‚Plaques‘ entspricht der Zahl der infektiösen Toxoplasmen zum Zeitpunkt der Infektion.

Kristallviolett-Lösung: 25 g Kristallviolett in 250 ml EtOH lösen
+ 1000 ml 1% Ammoniumoxalat

5.5 Mikrobiologische Methoden

Beim Umgang mit den verschiedenen Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Der mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert.

5.5.1 Haltung und Sicherung von Bakterienstämmen

Alle benutzten Bakterienstämme wurden vor der Benutzung aus tief gefrorenen Stocks auf LB-Agar Platten (4.6), die gegebenenfalls mit einem entsprechend selektiven Antibiotikum supplementiert wurden, mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und bei 37°C bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Die kurzfristige Sicherung neuer Stämme erfolgte durch Haltung auf LB-Agar Platten (4.5) versehen mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 4°C. Zur langfristigen Sicherung wurde 1 ml einer ü.N. Kultur (5.5.2) in einem sterilen Stockgläschen mit 200 µl sterilem 87% (v/v) Glycerin versetzt, 30 min bei RT inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C als Stock gelagert.

5.5.2 Anzucht von ü.N.-Kulturen

Zur Anzucht von ü.N.-Bakterienkulturen wurden Einzelkolonien von einer LB-Platte (4.6) in 3 ml LB-Medium, dem gegebenenfalls Antibiotikum zugesetzt wurde, überimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C ü.N. inkubiert.

5.5.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen wurde nach der von (Dagert und Ehrlich, 1979) publizierten Methode verfahren. Dazu wurden 100 ml LB-Medium (4.6) mit 1 ml einer ü.N.-Kultur (5.5.2) des entsprechenden *E. coli* Stammes angeimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{560}) von 0,5 angezogen. Nach Umfüllen der Kulturen in sterile 50 ml Röhrchen wurden diese 20 min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 3750 x g, 4°C (Heraeus Zellkulturzentrifuge) im Ausschwingrotor. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 0,5 Volumen 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Die Resuspension wurde erneut wie oben zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 1/25 Volumen 0,085 M $CaCl_2$ mit 15% Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die resuspendierten kompetenten Zellen wurden in Aliquots zu je 200 µl in sterile Eppendorfgefäße überführt und anschließend für ein bis 24 h bei 4°C inkubiert. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

5.5.4 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Transformation kompetenter Zellen wurde die Methode nach (Hanahan D, 1985) angewandt. 200 µl transformationskompetenter *E. coli* Zellen (5.5.4) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden zu 5 bis 10 ng Plasmid-DNA oder im Falle der Transformation von Ligierungsansätzen jeweils ein Drittel bzw. zwei Drittel des Ansatzes in einem Volumen von 20 µl vorsichtig mit den Zellen vermischt und 60 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für drei Minuten bei 42°C und im Anschluß daran wurde der Ansatz mit 800 µl auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium versetzt und 60 bis 90 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 200 µl des Ansatzes auf LB-Platten ausgestrichen und die Platten ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen pro µg Plasmid-DNA konnte nach ü.N. Inkubation durch Auszählen der Kolonien pro Platte ermittelt werden. Die Transformationseffizienz lag bei den hier verwendeten pUC-Derivaten zwischen 1 und 6×10^5 Transformanden pro µg Plasmid-DNA.

5.6 Molekularbiologische Methoden

5.6.1 UV/VIS-Spektroskopie

5.6.1.1 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung reiner Nukleinsäurelösungen wurde in einem Photometer (DNA/RNA Calculator II, Pharmacia) mit Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel (TE-Puffer oder *Aqua dest.*). Zur Berechnung der Konzentration wurden, nach Verrechnung des Verdünnungsfaktors, vereinfacht folgende Beziehungen verwendet:

$$A_{260} \cong 37 \mu\text{g ssNS/ml}$$

$$A_{260} \cong 50 \mu\text{g dsNS/ml}$$

Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt hier Auskunft über mögliche Verunreinigungen der Nukleinsäuren. Reine Präparationen sollten A_{260}/A_{280} -Werte zwischen 1,8 und 2,0 besitzen, Kontaminationen durch Proteine und besonders Phenol führen zu deutlich geringeren Quotienten, was eine genaue Konzentrationsbestimmung erschwert.

5.6.1.2 Streumessung

Das Bakterienwachstum wurde in einem Spektralphotometer (Beckmann Modell 34) durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (Streumessung) verfolgt. Um im linearen Bereich messen zu können, wurde die Suspensionen bei Bedarf mit sterilem LB-Medium so verdünnt, dass die resultierende OD maximal 1,0 betrug. Zur Kalibrierung des Photometers wurde steriles LB-Medium verwendet.

5.6.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Der Assay wurde in einer 96-well-Flachbodenplatte (Greiner) durchgeführt. Dazu wurde als Standard BSA beginnend mit 200 µg/ml verdünnt bis 10 µg/ml eingesetzt. Die Probe wurde ebenfalls in einer Verdünnungsreihe mit je 20 µl pro well vorgelegt. Danach wurden zu jedem well 200 µl frisch angesetztes Bradfordreagenz hinzu gegeben. Anschließend wurde sofort die Farbentwicklung mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Konzentration der Proteinlösung konnte mit Hilfe der Standardkurve berechnet werden.

Bradford-Reagenz: 3 ml Bradford-Stammlösung
+ 17 ml A. dest. (autoklaviert)

Bradford-Stammlösung: 100 mg Coomassie Blue G
+ 50 ml Ethanol 97%
+ 100 ml Phosphorsäure 85%

Die Stammlösung wurde bei 4°C in einer Licht-undurchlässigen Flasche aufbewahrt.

5.6.2 Aufreinigung von DNA

5.6.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um wässrige Nukleinsäurelösungen von Proteinen zu befreien, wurden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dazu wurde die zu reinigende Lösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform versetzt und mindestens eine Minute sorgfältig auf dem Vortex gemischt. Die Probe wurde dann zur schnellen Phasentrennung drei Minuten zentrifugiert (15000 rpm, Hettich Tischzentrifuge), der wässrige Überstand wurde ohne Interphase abgenommen und solange extrahiert, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Anschließend wurde die Lösung mit einem Volumen Chloroform extrahiert, um organische Rückstände zu entfernen. Dazu wurde ein Volumen Chloroform zugegeben, gut gemischt und wiederum drei Minuten zentrifugiert (15000 rpm, Hettich Tischzentrifuge). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.6.2.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die zu fällenden Lösungen wurden, sofern es die Salzkonzentrationen es erforderten, mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und dann mit 2,5 Volumen eiskaltem absoluten Ethanol vermischt und entweder in flüssigem Stickstoff gefroren oder 30 min bei -20°C gefällt. Danach wurden die gefällten Nukleinsäuren sofort 30 min bei 15000 rpm, 4°C (Hettich Tischzentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für zehn Minuten, bei 13000 rpm, 4°C (Hettich Tischzentrifuge) wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in TE-Puffer (4.5) oder *Aqua dest.* aufgenommen.

5.6.3 Enzymatische Reaktionen

5.6.3.1 Restriktionshydrolysen

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen vom Typ II (Roberts, 1979), bei welchen die Erkennungs- und Spaltungssequenz jeweils identisch ist. Die hydrolytische Spaltung doppelsträngiger DNA führte, abhängig von der eingesetzten Restriktionsendonuklease, entweder zu glatten oder zu 3'- bzw. 5'-überhängenden Enden an den entstandenen dsDNA-Fragmenten. Die hier benutzten Restriktionsenzyme wurden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Probe entweder hitzeinaktiviert oder mit einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert (5.6.2.1). Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden anschließend mit Agarosegelen (5.6.8.1) analysiert.

5.6.3.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die 5'-Enden linearisierter Klonierungsvektoren wurden zur Vermeidung der Religation vor dem Einsatz in Ligationsreaktionen (5.6.3.4) durch Behandlung mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Hierzu wurden 100 pmol überhängende 5'-Enden bzw. zwei pmol glatte Enden mit 1 Einheit SAP in 1x SAP-

Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung für 20 min bei 80°C gestoppt.

5.6.3.3 Klenow-Reaktion zum Auffüllen von überhängenden 5'-DNA Enden

Mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I können 5'-überhängende Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente mit den entsprechend komplementären Nukleotiden aufgefüllt werden. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben des ‚Nick Translation Kits‘ (Roche) durchgeführt. Für die radioaktive Markierung wurde α -³²P dCTP als markiertes Nukleotid zugesetzt.

5.6.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligrationsreaktion von doppelsträngigen ‚blunt end‘ bzw. überhängenden-DNA-Fragmenten mit linearisierten Klonierungsvektoren wurde mit dem ‚Rapid-DNA Ligation Kit‘ (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Abschluss der Ligation wurde der Reaktionsansatz ohne weitere Behandlung sofort zur Transformation kompetenter Zellen (5.5.3) eingesetzt.

5.6.3.5 cDNA-Synthese

Um bestimmte mRNA-Transkripte in Gesamt-RNA (5.6.4.4) qualitativ bzw. semiquantitativ nachzuweisen bzw. zu amplifizieren, wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde der ‚Advantage RT-for-PCR Kit‘ (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.6.3.6 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Zur Generierung von DNA-Fragmenten für Vektorkonstrukte sowie für die semiquantitative Analyse von cDNA-Proben wurden PCR-Reaktionen in einem Thermocycler (PCR Express Gradient, Hybaid) durchgeführt.

Standard-Reaktionsansatz:

Standard-Thermoprofil:

1-5 µl Template	95°C, 5 min	} 30 Zyklen
5 µl 10x Polymerase-Puffer	95°C, 30 s	
400 µM dNTP-Mix	62°C, 30-60 s	
1 µM Primer	72°C, 60 sec	
2.5 U Polymerase	72°C, 7 min	
Aqua dest. ad 50 µl		

Als Polymerasen wurden Taq-DNA-Polymerase oder für Klonierzwecke die ‚Expand High Fidelity DNA-Polymerase‘ verwendet. Die PCR Produkte wurden bei 4°C gelagert und in einem Agarosegel (5.6.8.1) aufgetrennt.

5.6.3.7 DNA-Sequenzierungen

DNA Sequenzierungen von PCR-Fragmenten und klonierten Vektoren wurden von der Firma GATC (Konstanz) mit spezifischen Primern und Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden auf einem ABI 3700 (Applied Biosystems) durchgeführt.

5.6.4 Isolation von Nukleinsäuren

5.6.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur schnellen analytischen Präparation von Plasmid-DNA aus ü.N.-Kulturen (5.5.2) wurde der ‚Plasmid DNA Minipreparation Kit‘ (Quiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem ‚Plasmid DNA Maxipreparation Kit‘ (Quiagen).

5.6.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Präparation von dsDNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die zu isolierende Bande mit Hilfe eines sterilen Skalpells auf dem UV-Schirm bei 340 nm ausgeschnitten. Die DNA in der Bande wurde mit dem ‚Gel Extraction Kit‘ (Quiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

5.6.4.3 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurden je nach Ausgangsmaterial 3×10^7 Toxoplasmen oder 3×10^6 eukaryontische Zellen bis zu 100 mg zerriebenes Mausegewebe eingesetzt. Die Zellen wurden in 1 ml DNA-Lysepuffer aufgenommen und die Suspension frisch mit 100 µg/ml Proteinase K und 20 µg/ml RNase A versetzt. Die Lyse der Proteine und der RNA erfolgte für 16 h bei 50°C im Eppendorfschüttler. Nach der Inkubation wurde die genomische DNA wie beschrieben (5.6.2.1) extrahiert und gefällt (5.6.2.2). Die gefällte genomische DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

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

5.6.4.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Lösungen, die für Experimente mit RNA bestimmt waren, wurden immer mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und nach Inkubation über Nacht autoklaviert bzw. mit DEPC-behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) angesetzt.

Gesamt-RNA wurde entweder mit dem ‚RNA-Preparation‘ Kit (Roche) nach Herstellerangaben gewonnen oder durch Lyse der Zellen mit Guanidinium-

Isothiocyanat (GSCN) und anschließender Ultrazentrifugation des Lysats auf einem Cäsiumchlorid-Dichtekissen (Sambrook *et al.*, 1989). Die GSCN Methode nutzt die Tatsache aus, dass RNA in Cäsiumchlorid eine höhere Schwebedichte hat als andere Zellbestandteile und deshalb bei der Zentrifugation pelletiert wird, während DNA, Lipide und Proteine im Überstand verbleiben.

10^9 zweifach mit PBS gewaschene Toxoplasmen wurden mit 4 ml GSCN-Lösung in einem Greiner Röhrchen lysiert und die Lösung mit 3 ml DEPC-Wasser aufgefüllt. In einem Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) wurden 3 ml des Cäsiumchlorid-Dichtekissens vorgelegt und dieses mit Lysat überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation (Ultrazentrifuge Beckman Optima L60) bei $150000 \times g$ und 23°C für 16 Stunden (Rotor SW41Ti, Beckman) ohne Bremse. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und der Boden des Röhrchens mit einem heißen Skalpell abgeschnitten. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und dann in $50 \mu\text{l}$ 10 mM Tris / DEPC-Wasser, pH 7,5 gelöst. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden photometrisch (5.6.1.1) bestimmt.

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

Die fertige Lösung wurde steril filtriert.

CsCl-Lösung: 5,7 M Cäsiumchlorid
 0,1 M EDTA pH 8
 0,002 Vol. DEPC

Die fertige Lösung inkubierte für 30 min bei RT und wurde anschließend autoklaviert.

DEPC-Wasser: *Aqua dest.* wurde mit 0,1% DEPC versetzt über Nacht bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert

5.6.5 Rekombinante Expression von *T. gondii* eIF4A in *E. coli*

Für die rekombinante Expression von eIF4A wurde der komplette ‚open reading frame‘ (ORF) (Accession-Nr. AJ320155) des eIF4A per PCR (5.6.3.6) aus *Toxoplasma gondii* cDNA (5.6.3.5) mit spezifischen Primern 5‘ToifPCR und 3‘Toif-PCR amplifiziert, so dass das Fragment an beiden Seiten eine *EcoRI*-Schnittstelle trug. Das 1245 bp große PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* an beiden Seiten restringiert (5.6.3.1) und in den ebenfalls mit *EcoRI* geschnittenen Expressionsvektor pET29a (Novagen) ligiert (5.6.3.4). Der Ligationsansatz wurde in XL1blue transformiert (5.5.4) und positive Transformanten in der richtigen Orientierung durch Restriktionsanalyse mit *XhoI* identifiziert. Das isolierte Expressionsplasmid pETeIF4A kodiert dabei für *T. gondii* eIF4A, versehen mit einem N-terminalen S-Tag unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Dieses Plasmid wurde daraufhin in BL21(DE3)pLysS transformiert. In diesem teilweise Protease-defizienten Stamm erfolgte die Expression von eIF4A mittels IPTG Induktion. Dazu wurden in einem 250 ml Erlenmeyerkolben eine Einzelkolonie des mit pETeIF4A transformierten BL21(DE3)pLysS in 50 ml LB-Medium angeimpft und für ca. drei Stunden bei 37°C geschüttelt. Bei Erreichen einer Zelldichte von 0,6 OD_{600nm} (5.6.1.2) wurde die Kultur auf 1 mM IPTG eingestellt und für weitere vier Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml Röhrchen abzentrifugiert 15 min, 3750 x g, 4°C (Heraeus Zellkulturzentrifuge) in 5 ml 20 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und fünfmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Das Zelllysat wurde dann auf Eppendorfröhrchen aliquotiert, für zehn Minuten mit 14000 x g, 4°C (Hettich Tischzentrifuge) zentrifugiert und die pelletierten ‚inclusion bodies‘ in 4 ml 20 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Nach Zentrifugation für zehn Minuten mit 14000 x g, 4°C (Hettich Tischzentrifuge) wurden die ‚inclusion bodies‘ nochmals gewaschen und in *A. dest.* aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde wie in (5.6.1.3) beschrieben bestimmt.

5.6.6 Isolation genomischer *GRA7* Sequenzen von *T. gondii*

'Genome walking'

Die Sequenzinformation der genomischen Sequenzen stromauf- und abwärts des *gra7*-Lokus wurden durch 'genome walking' isoliert. Es wurde dafür das 'genome walking' Kit von Clontech verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde 0,5 µg genomische DNA von *Toxoplasma gondii* des Stamms BK verwendet (5.6.4.3) und in jeweils einem Ansatz mit *Dral* bzw. *Stul* vollständig restringiert. Die entstandenen glatten DNA-Fragmente wurden mit dem 'Genome Walker' Adaptor ligiert. Mit dieser Population von genomischen Fragmenten ('Genome Walker' Bibliothek), die beiderseits mit Adaptoren versehen waren, wurde der erste PCR-Schritt durchgeführt (s. Herstellerangaben). Als Adaptorprimer wurde AP1 und als genspezifischer Primer GSP1A (*Dral*-Bibliothek) bzw. GSP2B (*Stul*-Bibliothek) verwendet. Dieser ersten PCR schloss sich für die *Dral*-Bibliothek noch der zweite 'nested' PCR-Ansatz an (Primer: AP2 und GSP1B), wohingegen das PCR-Amplifikat der *Stul*-Bibliothek ohne diesen Schritt weiterverwendet wurde. Sowohl das PCR-Produkt mit der *Dral*-Bibliothek (2 kb) als auch das PCR-Produkt der *Stul*-Bibliothek (2,6 kb) wurden aus dem Agarosegel isoliert. Die PCR-Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert und die insertierten PCR-Produkte in den Vektoren p5'*Dral* und p3'*Stul* sequenziert (5.6.3.7). Das klonierte PCR-Fragment überlappt im Plasmid p5'*Dral* mit dem stromaufwärts liegenden Bereich vom *GRA7* Genlokus und im p3'*Stul* Plasmid mit dem stromabwärts liegenden Bereich vom *GRA7* Genlokus. Die Sequenzierung konnte nach der kürzlich abgeschlossenen kompletten Sequenzierung des *T. gondii* Genoms auch mit Genbanksequenzdaten bestätigt werden.

5.6.7 Southernblot zur Identifikation von *GRA7* 'knock out'

Mutanten

In der vorliegenden Arbeit wurden neutrale Southern-Blots (Maniatis *et al.*, 1982) durchgeführt. Dazu wurde die im Agarosegel über Nacht aufgetrennte *XhoI* restringierte genomische DNA zunächst 15 min in 0,2 N HCl depuriniert und für 45 min in Southern II-Lösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) denaturiert. Nach kurzem

Schwenken in destilliertem *Aqua dest.* wurde das Gel für 30 min in Southern III (0,5 M Tris, 3 M NaCl, pH 8) neutralisiert und in 10x SSC bei RT ü.N. auf eine positiv geladene Polyamidmembran geblottet. Die Membran wurde 15 min getrocknet und bei 0,6 J und 340 nm wurde die DNA auf der Membran fixiert. Die Prähybridisierung erfolgte für 60 min bei 68°C in Hybridisierungslösung. Für die Hybridisierung wurde der Hybridisierungslösung ein Markierungsansatz (5.6.3.3) einer radioaktiv markierten Sonde zugesetzt. Für die *gra7*-spezifische Sonde wurde ein *HindIII* Restriktionsfragment des Plasmids pGRA7KIN und für die CAT spezifische Sonde ein *NsiI/NcoI* Restriktionsfragment des pLDH1+Myc radioaktiv markiert. Nach der Hybridisierung über Nacht bei 68°C wurde die Membran zweimal fünf Minuten bei RT mit 2x SSC, 0,1% SDS gewaschen und zweimal 15 min bei 68°C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS. Die Membran wurde feucht in Frischhaltefolie eingeschlagen und die Exposition erfolgte mit einem Röntgenfilm in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie für 24 h bei -70°C.

Hybridisierungslösung: 5 x SSC
 10% Blocklösung
 0,1% N-Laurylsarcosin
 0,02% SDS

5.6.8 Gelelektrophoresen

5.6.8.1 Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurde in 0,5 bis 2% Agarosegelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Als Puffer diente 1x TBE, die Auftrennung erfolgte bei 60 bis 100 V. Für die Dokumentation wurden die Gele anschließend mit dem Gelaufnahmegerät „Modul Digit-Store Duo“ (Intas, Göttingen) bei 340 nm fotografiert.

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

5.6.8.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE; (Laemmli, 1970)) benutzt. Hierbei wird als denaturierendes Agens SDS eingesetzt, welches als amphiphiles Detergenz die native Proteinstruktur auffaltet. Die zu analysierenden Proteine werden aufgrund der denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Proteine werden zunächst in einem Sammelgel fokussiert und dann in einem Trenngel aufgetrennt.

Die Proteinproben wurden zunächst mit 0,2fach SDS-Probenpuffer vermischt und fünf Minuten aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei einer Spannung von 100 V, bis der Bromphenolblau-Marker die Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung bis zum Ende der Elektrophorese auf 200 V erhöht. Bei Elektrophoresen über Nacht wurde eine konstante Spannung von 40 V angelegt, die Elektrophorese von Minigelen wurde mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt.

Lösung A: rotiphorese Gel 30 (Gebrauchsfertige Lösung, 37,5 Teile Acrylamid, 1 Teil 0,8% Bisacrylamid; Fa. Roth, Karlsruhe)

Lösung B: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (entgast)

Lösung C: 10% (w/v) SDS in H₂O

Lösung D: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (entgast)

Elektrophoresepuffer: 28,8 g/l (w/v) Glycin
6 g/l (w/v) Tris
1 g/l (w/v) SDS

Sammelgellösung: 100 ml Lösung A
250 ml Lösung D
10 ml Lösung C
650 ml H₂O

SDS-Probenpuffer: 2 g SDS
 75 ml Lösung D
 25 ml 50% Glycin
 ad libitum Bromphenolblau
 (+ 5% β -Mercaptoethanol)

Für ein 12% SDS-Gel wurden folgende Lösungen gemischt:

Trenngel: 8 ml Lösung A
 5 ml Lösung B
 0,2 ml Lösung C
 6 ml entgastes *A. dest.*

Das gegossenen Trenngel wurde mit n-Butanol überschichtet, um einen gleichmäßigen Abschluss zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol abgenommen, das Sammelgel darüber gegossen und mit einem Kamm die Probenkanäle ausgespart.

Sammelgel: 10 ml Sammelgellösung
 + 100 μ l 10% APS
 + 10 μ l TEMED

Die Detektion der Banden erfolgte durch Coomassie-Färbung (5.7.3.1).

5.6.8.3 Zweidimensionale Proteinauftrennung

Bei der zweidimensionalen Auftrennung (O'Farrell, 1975) werden Proteingemische in der ersten Dimension in einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt und erst in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dadurch wird eine hochauflösende Proteinauftrennung erreicht. Zur Verbesserung der Auftrennung und der Reproduzierbarkeit der Fokussierung wurden in dieser Arbeit in Anlehnung an die Methode nach O'Farrell immobilisierte pH-Gradienten (IPG) verwendet. Für die IEF in

immobilisierten pH-Gradienten wurde mit Material und Geräten von Amersham Pharmacia Biotech gearbeitet. 1 mg lyophilisiertes Toxoplasma-lysate (5.7.1) wurde in Rabilloud-Puffer (Rabilloud *et al.*, 1997) gelöst. Pro IPG-Streifen (pH 3-10, 18 cm, NL) wurden 350 µl Rabilloud-Puffer verwendet. Die IPG-Streifen wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit der gelösten Probe rehydriert. Die Fokussierung erfolgte bei 20°C in der ‚Multiphor II‘-Elektrophoresekammer bei einer maximalen Spannung von 3500 Volt. Die Spannung wurde bis 3500 V so erhöht, dass ein Maximalstrom von 50 µA pro IPG-Streifen nicht überschritten wurde. 3500 V wurden gehalten, bis die Stromstärke auf ca. ein Zehntel des Ausgangswerts gesunken war. Anschließend wurde die Fokussierung abgebrochen und die Streifen entweder direkt in der zweiten Dimension aufgetrennt oder in einer Folie eingeschweißt bei -80°C gelagert.

Für die Auftrennung nach dem Molekulargewicht mussten die fokussierten Proteine mit SDS beladen werden. Dazu wurden die IPG-Streifen bei RT 15 min mit Äquilibriumspuffer I und 15 min mit Äquilibriumspuffer II äquilibriert. Die Streifen wurden anschließend auf das Sammelgel von einem Millimeter Dicke aufgelegt und mit Agarose fixiert. Die Elektrophorese erfolgte nun wie unter 5.6.8.2 beschrieben. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele entweder geblottet (5.7.3.3) oder gefärbt (5.7.3.1 + 5.7.3.2).

Rabilloud-Puffer: 0,5% Triton X-100
 2 M Thioharnstoff
 7 M Harnstoff
 4% CHAPS

Aliquots zu je 2 ml wurden bei -20 °C gelagert, vor Gebrauch aufgetaut und mit 20 mg DTT und 20 µl Ampholyten versetzt.

Äquilibriumspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,5
 2% SDS
 30% Glycerin
 6 M Harnstoff
 Bromphenolblau

Dieser Puffer wurde in Aliquots bei -20°C gelagert. Vor dem Äquilibrieren der Streifen wurde dem Äquilibrierungspuffer I zehn Milligramm DTT und dem Äquilibrierungspuffer II 480 mg Iodacetamid zugeben.

Agarose: 0,5 g Agarose
 12,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
 1 ml 10% SDS
 36,5 ml *A. dest.*

5.7 Proteinanalysen

5.7.1 Präparation von Toxoplasma-Lysat

Für die Präparation von Toxoplasma-Lysat wurden Tachyzoiten verschiedener Isolate verwendet. Sie wurden nach dem Ernten zweimal in PBS gewaschen, abzentrifugiert (15 min, 600 x g, 4°C) und pelletiert bis zur Aufarbeitung bei -70°C aufbewahrt. Die Sedimente wurden nach dem Auftauen in *Aqua dest.* vereinigt und auf 10^9 Toxoplasmen/ml eingestellt. Diese Suspension wurde zehnmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Um große Membrantrümmer und nicht aufgeschlossene Toxoplasmen abzutrennen, wurde das Lysat einmal für 15 min mit 800 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand nochmals für 15 min mit 10000 x g bei 4°C zentrifugiert. Dieser Überstand wird im Folgenden als TLA bezeichnet und enthält primär die löslichen Proteine von *T. gondii* Tachyzoiten. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (5.6.1.3) wurde das TLA aliquotiert bei -70°C gelagert.

5.7.2 Zellfraktionierung und Triton X-114 Partitionierung

Für die mechanische Fraktionierung von Toxoplasma-Lysat wurden frisch geerntete Tachyzoiten (5.4.1) wie beschrieben gewonnen und für 15 min mit 800 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment der TLA-Präparation (5.7.1) enthält große Membrantrümmer und noch nicht aufgeschlossene Tachyzoiten, wohingegen im Überstand nach Zentrifugation lösliche Proteine und kleinere Membranbestandteile

vorliegen. Dieser Überstand wurde anschließend für eine Stunde bei 100000 x g zentrifugiert (Optima TL, Beckman), wobei alle membrangebundenen Moleküle und Membranbestandteile pelletiert werden, während im Überstand nur lösliche Moleküle nachweisbar sind. Das Sediment wurde nach der Zentrifugation bei 100000 x g mit Triton X-114 partitioniert, um integrale Membranmoleküle von peripher Assoziierten abzutrennen. Dazu wurde ca. 1 mg des 100000 x g Pellets in PBS aufgenommen und mit 2% (v/v) Triton X-114 versetzt. Diese Suspension wurde für eine Stunde auf Eis inkubiert und danach wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 10000 x g, 4°C für zehn Minuten abgetrennt. Der lösliche Überstand wurde für zehn Minuten bei 37°C inkubiert und die wässrige und Detergenzphase durch Zentrifugation (zehn Minuten, 25°C, 10000 x g) partitioniert. Die Detergenzphase wurde anschließend noch dreimal mit PBS und die wässrige Phase dreimal mit 2% Triton X-114 extrahiert und jeweils durch Zentrifugation für zehn Minuten, 25°C, 10000 x g partitioniert. Die beiden Phasen wurden danach mit zehn Volumen eiskaltem Azeton über Nacht bei -20°C gefällt und das Präzipitat für 15 min bei 10000 x g, 4°C abzentrifugiert.

Alle Fraktionen sowohl der mechanischen Fraktionierung als auch der Triton X-114-Partitionierung wurden in PBS aufgenommen und die Proteinkonzentration (5.6.1.3) bestimmt.

5.7.3 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

5.7.3.1 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE (5.6.8.2/3) erfolgte mit dem Farbstoff ‚Coomassie Brilliant Blue R250‘. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese in Coomassie-Färbelösung über Nacht unter leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler gefärbt und anschließend in Entfärbelösung für drei bis 24 h wieder entfärbt. Bei diesem Entfärbvorgang können die Proteine als dunkelblau gefärbte Banden oder Spots vor dem hellblauen Hintergrund detektiert werden.

Coomassie-Färbelösung: 50% (v/v) Ethanol

7,5% (v/v) Essigsäure

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

5.7.3.3 Elektrotransfer von Proteinen für den Immunonachweis (Western Blot)

Zur Identifizierung von Proteinen nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (5.6.8.2) wurden die aufgetrennten Proteine in einem ‚Semi-Dry-Blot‘ (‚CarboGlas‘, Schleicher & Schüll, Dassel) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Drei Lagen in Kathodenpuffer getränkte ‚Whatman 3 MM‘-Papierstücke, die der Größe des Gels entsprachen, wurden ohne Luftblasen auf die Kathodenplatte gelegt. Darüber wurde das in Kathodenpuffer getränkte Gel und darauf die mit Anodenpuffer I befeuchtete Membran gelegt. Es folgten wieder drei Filterpapiere, die in Anodenpuffer I angefeuchtet wurden. Als Abschluss dienten drei Filterpapiere, die in Anodenpuffer II getränkt wurden. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche. Die Transferdauer richtet sich je nach Proteingröße und dauerte ca. 30 bis 60 Minuten.

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

Anodenpuffer I: 30 mM Tris
 20% (v/v) Methanol

Anodenpuffer II: 300 mM (w/v) Tris
 20% (v/v) Methanol

5.7.3.4 Immunonachweis von Proteinen

Nach dem Elektrotransfer der Proteine (5.7.3.3) wurde die Membran zunächst zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindestellen mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Blocklösung (5% fettfreies Milchpulver in PBS) unter leichtem Schütteln inkubiert. Primär- und Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper wurden in Blocklösung verdünnt und für jeweils mindestens eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert. Im Anschluss an jede Inkubation wurde

die Membran zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Zur Entwicklung wurde das Chemilumineszenz-Substrat ‚Super Signal‘ (Pierce) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Lumineszenz wurde mit Röntgenfilmen (Kodak) detektiert. Dazu wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt und in einer Expositionskassette für eine Sekunde bis maximal eine halbe Stunde exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einer Entwicklerlösung (Kodak) für eine bis fünf Minuten. Der Entwicklungsprozess wurde nach kurzem Wässern in einem Fixierbad (Kodak) gleichzeitig gestoppt und fixiert. Abschließend wurden die Filme mit *A. dest.* gewässert und getrocknet. Nach der Digitalisierung mit einem DUCHLIGHTScanner (Epson GT-9600) erfolgte falls nötig eine Quantifizierung mit dem Softwareprogramm ScionImage (Scion Corp., USA).

5.7.4 ‚Enzyme linked immunosorbent assay‘ (ELISA)

Die Anwesenheit von Zytokinen, Antikörpern und anderen Proteinen in Seren und Zellüberständen wurde im ELISA untersucht. Der Nachweis erfolgte photometrisch mit Hilfe von monoklonalen anti-Zytokinantikörpern und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern nach enzymatischer Umsetzung eines Chromogens. Dabei gibt es zwei verschiedene ELISA Verfahren. Bei einem ‚Sandwich-ELISA‘ wurde ein Primärantikörper (in PBS pH 9 titriert) an eine ELISA-Mikrotiterplatte (‚Maxi-Sorp‘, Nunc) bei 4°C über Nacht angelagert. Nach der Anlagerung erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit zehn Prozent FCS in PBS für mindestens eine Stunde bei 37°C. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit einem Zytokin-Standard und der titrierten Probe. Nach fünfmaligem Waschen der Mikrotiterplatte wurde der Ansatz mit einem biotinylierten Sekundärantikörper in 1% (w/v) BSA in PBS für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Erneut wurde fünfmal gewaschen und anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min (37°C) mit Streptavidin-Peroxidase in 1% (w/v) BSA in PBS. Nach dem letzten Waschgang wurde durch Zugabe des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Sigma) eine blaue Farbentwicklung bei Raumtemperatur beobachtet. Diese Reaktion wurde mit der 1 N H₂SO₄ gestoppt, sobald sich der Leerwert verfärbte. Die Produktmenge wurde über die Extinktion bei 450 nm im Photometer (Rainbow, Tecan) quantifiziert.

Bei dem zweiten ELISA-Verfahren handelt es sich um den so genannten ‚Festphasen-ELISA‘. Mit diesem Test wurden *T. gondii* spezifische Ak in Mausseren nachgewiesen und somit die Infiziertheit von Mäusen bestimmt. Im Unterschied zum ‚Sandwich-ELISA‘ wurde direkt 25 µg TLA in PBS an die ELISA-Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C angelagert. Nach der Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte die Inkubation mit den Maus-Antikörpern. Die Bindung von TLA-reaktiven Maus Antikörpern wurde durch Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten anti-Maus Ak detektiert. Der weitere Ablauf erfolgte wie bei dem ‚Sandwich-ELISA‘ beschrieben. Zur Auswertung der ELISA-Daten wurde die Software von Tecan (Easy win fitting) und zur Darstellung ‚Graphpad Prism‘ verwendet (Graphpad Software, San Diego, USA).

Waschlösung: 0,05% (v/v) Tween-20 in PBS

5.7.5 Quantitativer Proteomvergleich

Digitalisierte Aufnahmen von Coomassie-gefärbten 2D-Gelen (5.7.3.1) wurden als Basis für die vergleichenden Analysen verwendet. Das Spotmuster wurde mit der AIDA Proteomix Software (Raytest) analysiert. Pro Gelbild wurden ca. 300 einzelne Proteinspots markiert, die relative Lage sowie Spotvolumina aufgenommen und diese dann auf einem Referenzgel zugeordnet. Für den Vergleich verschiedener Proteinmuster wurde aus den Daten der Einzelgele einer Probengruppe ein virtuelles Gel erstellt, welches dem Mittelwert aus allen Gelen derselben Probengruppe entspricht. Diese virtuellen ‚Master‘-Gele wurde anschließend Spot für Spot miteinander verglichen und volumetrische Unterschiede quantifiziert.

5.7.6 Identifizierung einzelner Proteine im 2D-Gel

Die Identifikation isolierter Proteinspots im 2D-Gel erfolgte durch Massenspektrometrie und/oder durch Immunonachweis (5.7.3.4). Die Massenspektrometrie wurde im Biologisch Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ), der HHU Düsseldorf durchgeführt. Für die Massenspektrometrie wurden

einzelne Spot aus dem 2D-Gel ausgestochen und im Gel mit Trypsin verdaut. Die Peptidfragmente wurden aus der Gelmatrix eluiert, lyophilisiert und in 5% Ameisensäure aufgenommen. Nach Entsalzung der Probe über eine ZipTipC₁₈ Säule wurden die Massenspektren mit einem ‚quadrupole-time-of-flight‘ Massenspektrometer (QSTAR, Applied Biosystems) aufgenommen. Einzelne Peptide wurden durch Tandem-Massenspektrometrie weiter analysiert und die Peptidsequenzen nach manueller Interpretation in der BLAST2-Datenbank identifiziert.

5.7.7 Immunfluoreszenzanalysen

Für die Analyse der subzellulären Verteilung von *T. gondii* Proteinen *in situ* bzw. für die Detektion von *T. gondii* in infizierten Peritonealexsudatzellen wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Hierzu wurden als Wirtszellen HS27-Monolayer verwendet, die auf Glasplättchen in 24-well-Platten angezogen wurden. Die Zellen wurden mit Toxoplasmen infiziert und bei geeigneter Vakuolengröße (~ 4-8 Tachyzoiten/Vakuole) in der 24-well-Platte mit 1 ml 3% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für zehn bis 20 min fixiert. Die Zellen wurden dann mit 1 ml 0,25% (v/v) Triton X-100 in PBS für zehn Minuten permeabilisiert und anschließend wurden für 30 min in 1 ml 1% (w/v) BSA in PBS die unspezifischen Antikörperbindungsstellen abgesättigt. Alle Antikörperfärbungen erfolgten auf einem 25 µl Tropfen von 1% (w/v) BSA in PBS, der auf Parafilm aufgetragen wurde. In 25 µl 1% (w/v) BSA in PBS wurden Primär- und anschließend Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper verdünnt und jede Färbung für eine Stunde in einer feuchten Atmosphäre durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Glasplättchen wieder in die 24-well-Platte überführt und mit drei Waschsritten in 1 ml PBS zu je fünf Minuten wurden ungebundene Antikörper entfernt. Nach der Färbung mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper wurde dem PBS im ersten Waschschrift 1,3 µg/ml DAPI zugesetzt, um die DNA der Zellkerne spezifisch anzufärben. Abschließend wurden die Glasplättchen kurz in *A. dest.* gewaschen und auf einem Objektträger auf einen Tropfen Fluoromount G aufgebracht. Nach mindestens 30 min Trocknungszeit konnten die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE 200 (Nikon) betrachtet und mit einer Digitalkamera aufgenommen werden.

5.8 Erzeugung von *Toxoplasma gondii* Mutanten

Für die Generierung der GRA7-ko-Mutante sowie der eIF4A- bzw. LDH1-überexprimierenden aBK-Mutanten war es nötig, *T. gondii* genetisch zu manipulieren und diese stabilen Mutanten zu klonieren.

Als Vektoren für die Toxoplasma-Transfektion wurden Plasmide pKS-Derivate (Stratagene) eingesetzt, die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) als Selektionsmarker unter der Kontrolle des *T. gondii* SAG1-Promoters tragen.

5.8.1 Überexpression von Proteinen in *T. gondii*

Für die Erzeugung der überexprimierenden aBK-Mutanten wurden in den Vektor pTub+Myc (freundliche Gabe von Boris Striepen, Athens, USA) zusätzlich die cDNA für eIF4A bzw. LDH1 unter der Kontrolle des β -Tubulin-Promotors eingefügt. An beide cDNA Sequenzen wurde außerdem vor dem Stopp-Codon noch die Sequenz für das myc-Epitop als ‚tag‘ angefügt. Dazu wurden PCR-Fragmente (5.6.3.6) von *T. gondii* cDNA mit den Primern 5'BamHleIFAEEx und 3'Avr2eIF4Aex bzw. 5'Bgl2LDH1Ex und 3'Avr2LDH1Ex amplifiziert, mit *Bam*HI bzw. *Bgl*II und *Avr*II restringiert und in den *Bgl*II und *Avr*II geschnittenen Vektor ligiert. Die resultierenden Expressionsplasmide für die Expression von eIF4A bzw. LDH1 in *T. gondii* wurden als pEIF4A+Myc bzw. pLDH1+Myc bezeichnet.

5.8.2 Zielvektor für den *GRA7* ‚knock out‘ mit homologer Rekombination

Für die Erzeugung einer ‚knock out‘ Mutante in *T. gondii* ist es essentiell, dass der Zielvektor 5'- und 3'-seitig vom Selektionsmarker mit ausreichend langen genomischen Fragmenten versehen ist, da in *Toxoplasma gondii* die nicht homologe Rekombination der homologen Rekombination stark bevorzugt ist (Roos *et al.*, 1994). Die homologen genomischen Sequenzen zum Zielgen im Targetvektor erhöhen die Wahrscheinlichkeit für homologe Rekombinationsereignisse am Zielgenort.

Aus diesem Grund wurden zur Generierung des Zielvektors für den *GRA7* ‚knock out‘ die in (5.6.6) gefundenen genomischen Sequenzdaten verwendet. Mit dem Plasmid p5'Dral (5.6.6) und den Primern 5'ApalGRA7KO und 3'HindIII GRA7KO wurden die ersten 2 kb der 5' stromaufwärts liegenden *GRA7* genomischen Sequenz generiert, mit *Apal* und *HindIII* restringiert und in den ebenso geschnittenen Vektor pTub1CAT (freundliche Gabe von Wolfgang Bohne, Göttingen) ligiert. Anschließend wurde das resultierende Plasmid (pGRA7KO-5'1) mit *HindIII* und *NsiI* geschnitten und in den Vektor das DNA-Fragment aus den komplementären, hybridisierten Oligonukleotiden ‚gap-o‘ und ‚gap-u‘ (47 bp) ligiert. Dabei wurde sowohl der β -Tubulinpromoter entfernt, als auch der zweite Teil der 5'-stromaufwärts liegenden *GRA7* genomischen Sequenz direkt vor das Startcodon des CAT eingefügt (pGRA7KO-5'2). Als letzter Schritt wurde nun ein 2,6 kb großes PCR-Fragment von dem Plasmid p3'Stul (5.6.6) und den Primern 5'GSP2B+SpeI und 3'AP1+NotI amplifiziert und mit *SpeI* und *NotI* geschnitten. Dieses PCR-Fragment wurde in den ebenso geschnittenen pKOGRA7-5'2 ligiert, so dass das CAT-Gen im Zielvektor (pGRA7KO) von 2 kb stromaufwärts und 2,6 kb stromabwärts zum *GRA7*-Genlokus liegenden genomischen Sequenzen flankiert wurde.

5.8.3 Transfektion von *Toxoplasma gondii*

Für die Transfektion von *T. gondii* ist die Elektroporation die gängigste Methode (Roos *et al.*, 1994). Hierzu wurden zehn bis 150 μg zu transfizierende Plasmid-DNA gefällt (5.6.2.2) und in 100 μl Cytomix aufgenommen. Frische extrazelluläre Toxoplasmen wurden geerntet und durch einen sterilen 3 μm Filter (Millipore) filtriert, um Wirtszellen abzutrennen. Die gefilterten Toxoplasmen wurden für 20 min bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert und in einer Konzentration von 1×10^8 /ml in Cytomix aufgenommen. Für die Elektroporation wurden die gelöste DNA und 300 μl der Toxoplasmen in eine 0,4 cm Elektroporationsküvette (Biorad) überführt, gemischt und falls verstärkt multiple Insertion des Plasmids gewünscht waren, wurden noch 50 Einheiten des Restriktionsenzym *NotI* zugegeben. Schließlich wurden die Parasiten mit einem 2000 V Puls bei 25 Ω und 25 μF elektroporiert (Genepulser II, Biorad). Nach der Elektroporation wurde die Küvette bei RT für 15 min inkubiert und die

Parasiten in eine konfluente 25 cm² Flasche mit HS27 überführt und bei 37°C inkubiert (5.3.2).

Cytomix:

120 mM KCl

0,15 mM CaCl₂

10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,6

25 mM HEPES, pH 7,6

2 mM EDTA

5 mM MgCl₂

2 mM ATP, frisch zugegeben

5 mM Glutathion, frisch zugegeben

5.8.4 Isolierung stabiler *T. gondii*-Transfektanten

Für die Isolierung stabiler *Toxoplasma gondii*-Transfektanten wurden dem Zellkulturmedium nach 24 h 6,8 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt. Die transfizierte Toxoplasma-Population wurden dann täglich mikroskopisch beobachtet und sobald ca. 80 bis 90% der Parasiten extrazellulär vorlagen, wurden 10% des Kulturansatzes in eine neu konfluente 25 cm² HS27 Flasche überführt. Nach ca. zehn bis 14 Tagen unter ständiger Chloramphenicolselektion wurden die überlebenden Parasiten als resistent beurteilt und konnten direkt in die Klonierung eingesetzt werden, die ebenfalls unter Chloramphenicolselektion durchgeführt wurde. Die Population verschiedener transfizierter Parasiten wurde mittels ‚limiting dilution‘ in 96-well-Platten mit konfluenten HS27 kloniert. Dazu wurden die geernteten Toxoplasmen gezählt und rechnerisch ein Parasit je well gegeben. Nach fünf bis sieben Tagen Inkubation der Klonierungsplatten wurden diese mikroskopisch begutachtet, und die wells mit nur einem Lysehof im HS27 Monolayer wurden als klonale Linien identifiziert. Alle Linien und auch alle unklonierten Populationen wurden standardmäßig unter Chloramphenicolgabe kultiviert.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, L. B., Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R., and Krahenbuhl, J. L. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* 144: 2725.
- Adams, P., Fowler, R., Kinsella, N., Howell, G., Farris, M., Coote, P., and O'Connor, C. D. 2001. Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics.* 1: 597.
- Ajioka, J., Fitzpatrick, J., and Reitter, C. 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Exp. Rev. Mol. Med.* 01: 1.
- Aliberti, J., Valenzuela, J. G., Carruthers, V. B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., CR, E. S., Fairlamb, A., Ribeiro, J. M., and Sher, A. 2003. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat. Immunol.*
- Aline, F., Bout, D., and Dimier-Poisson, I. 2002. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infect. Immun.* 70: 2368.
- Ardini, E., Pesole, G., Tagliabue, E., Magnifico, A., Castronovo, V., Sobel, M. E., Colnaghi, M. I., and Menard, S. 1998. The 67-kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1017.
- Audet, R. G., Goodchild, J., and Richter, J. D. 1987. Eukaryotic initiation factor 4A stimulates translation in microinjected *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* 121: 58.
- Bente, M., Harder, S., and Bruchhaus, I. 2002. Analysis of the proteome pattern of *Leishmania donovani* during stage differentiation. *Joint annual meeting for Parasitology, Abstract F.4.*
- Bliss, S. K., Butcher, B. A., and Denkers, E. Y. 2000. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J. Immunol.* 165: 4515.
- Blum, S., Schmid, S. R., Pause, A., Buser, P., Linder, P., Sonenberg, N., and Trachsel, H. 1992. ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 7664.
- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D. J., and Heesemann, J. 1995. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of

- Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol. Microbiol.* 16: 1221.
- Bonhomme, A., Maine, G. T., Beorchia, A., Burlet, H., Aubert, D., Villena, I., Hunt, J., Chovan, L., Howard, L., Brojanac, S., Sheu, M., Tyner, J., Pluot, M., and Pinon, J. M. 1998. Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 1411.
- Burg, J. L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L., and Boothroyd, J. C. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141: 3584.
- Carruthers, V. B. 1999. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol. Int.* 48: 1.
- Chardes, T. and Bout, D. 1993. Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res. Immunol.* 144: 57.
- Cordwell, S. J., Nouwens, A. S., and Walsh, B. J. 2001. Comparative proteomics of bacterial pathogens. *Proteomics.* 1: 461.
- Daga, R. R. and Jimenez, J. 1999. Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth. *J. Cell Sci.* 112 Pt 18: 3137.
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* 6: 23.
- Darde, M. L., Bouteille, B., and Pestre-Alexandre, M. 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78: 786.
- Darghouth, M. A., Ben Miled, L., Bouattour, A., Melrose, T. R., Brown, C. G., and Kilani, M. 1996. A preliminary study on the attenuation of Tunisian schizont-infected cell lines of *Theileria annulata*. *Parasitol. Res.* 82: 647.
- Däubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K. S., and Schroten, H. 2001. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 69: 6527.
- Demianova, M., Formosa, T. G., and Ellis, S. R. 1996. Yeast proteins related to the p40/laminin receptor precursor are essential components of the 40 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 271: 11383.

- Denton, H., Roberts, C. W., Alexander, J., Thong, K. W., and Coombs, G. H. 1996. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 137: 103.
- Derouin, F. and Garin, Y. J. 1991. *Toxoplasma gondii*: blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. *Exp. Parasitol.* 73: 460.
- Dimier, I. H. and Bout, D. T. 1998. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology.* 94: 488.
- Ding, M., Clayton, C., and Soldati, D. 2000. *Toxoplasma gondii* catalase: are there peroxisomes in toxoplasma? *J. Cell Sci.* 113 (Pt 13): 2409.
- Donald, R. G., Carter, D., Ullman, B., and 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.
- Dubey, J. P. 1998. Toxoplasmosis. 9: 303.
- Dzierszynski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M. F., and Tomavo, S. 2000. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 37: 574.
- Dzierszynski, F., Popescu, O., Tourse, C., Slomianny, C., Yahiaoui, B., and Tomavo, S. 1999. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans. *J. Biol. Chem.* 274: 24888.
- Ferguson, D. J., Jacobs, D., Saman, E., Dubremetz, J. F., and Wright, S. E. 1999. *In vivo* expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* 119 (Pt 3): 259.
- Ferreras, M., Gavilanes, J. G., and Garcia-Segura, J. M. 1993. A permanent Zn²⁺ reverse staining method for the detection and quantification of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 213: 206.
- Fischer, H. G., Nitzgen, B., Reichmann, G., Gross, U., and Hadding, U. 1997. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol. Res.* 83: 637.

- Ford, C. L., Randal-Whitis, L., and Ellis, S. R. 1999. Yeast proteins related to the p40/laminin receptor precursor are required for 20S ribosomal RNA processing and the maturation of 40S ribosomal subunits. *Cancer Res.* 59: 704.
- Fox, B. A. and Bzik, D. J. 2002. De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 415: 926.
- Frenkel, J. K. 1967. Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.* 98: 1309.
- Frenkel, J. K. 1973. Toxoplasma in and around us. *Bio. Science.* 23: 343.
- Fuentes, I., Rubio, J. M., Ramirez, C., and 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.
- Furtado, G. C., Cao, Y., and Joiner, K. A. 1992. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* 60: 4925.
- Galloni, M. and Edgar, B. A. 1999. Cell-autonomous and non-autonomous growth-defective mutants of *Drosophila melanogaster*. *Development.* 126: 2365.
- Gastens, M. H. and Fischer, H. G. 2002. *Toxoplasma gondii* eukaryotic translation initiation factor 4A associated with tachyzoite virulence is down-regulated in the bradyzoite stage. *Int. J. Parasitol.* 32: 1225.
- Gavrilescu, L. C. and Denkers, E. Y. 2001. IFNgamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 167: 902.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E. Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., and Sher, A. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFNgamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 153: 2533.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 913.
- Grigg, M. E., Bonnefoy, S., Hehl, A. B., Suzuki, Y., and Boothroyd, J. C. 2001. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science.* 294: 161.

- Grigg, M. E. and 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.
- Gross, U., Bohne, W., Lüder, C. G., Lugert, R., Seeber, F., Dittrich, C., Pohl, F., and Ferguson, D. J. 1996. Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 114S.
- Hakansson, S., Charron, A. J., and Sibley, L. D. 2001. Toxoplasma vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 20: 3132.
- Hakim, F. T., Gazzinelli, R. T., Denkers, E., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. 1991. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J. Immunol.* 147: 2310.
- Halonen, S. K., Taylor, G. A., and Weiss, L. M. 2001. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infect. Immun.* 69: 5573.
- Hanahan D. 1985. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. 166: 557.
- Hershey, J. W., Mathews, M. B., and Sonenberg, N. 1996. Origins and targets of translational control. *Translational control* (ed. J.W.B. Hershey and M.B. Mathews), Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1.
- Hisaeda, H., Nagasawa, H., Maeda, K., Maekawa, Y., Ishikawa, H., Ito, Y., Good, R. A., and Himeno, K. 1995. Gamma delta T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 155: 244.
- Howe, D. K. and Sibley, L. D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172: 1561.
- Howe, D. K., Summers, B. C., and Sibley, L. D. 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64: 5193.
- Jacobs, D., Dubremetz, J. F., Loyens, A., Bosman, F., and Saman, E. 1998. Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91: 237.

- Jacquet, A., Coulon, L., De Neve, J., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Bollen, A., Jurado, M., and Biemans, R. 2001. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116: 35.
- James, S. L. 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* 59: 533.
- Janeway, C. and Travers, P. 1997. *Immunologie*.
- Jenkins, Z. A., Haag, P. G., and Johansson, H. E. 2001. Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics.* 71: 101.
- Jerome, M. E., Radke, J. R., Bohne, W., Roos, D. S., and White, M. W. 1998. *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development. *Infect. Immun.* 66: 4838.
- Joiner, K. A. and Dubremetz, J. F. 1993. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect. Immun.* 61: 1169.
- Joiner, K. A. and Roos, D. S. 2002. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J. Cell Biol.* 157: 557.
- Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K., and Kaufmann, S. H. 1999. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol. Microbiol.* 33: 1103.
- Kang, H. and Suzuki, Y. 2001. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. *Infect. Immun.* 69: 2920.
- Kazmin, D. A., Chinenov, Y., Larson, E., and Starkey, J. R. 2003. Comparative modeling of the N-terminal domain of the 67kDa laminin-binding protein: implications for putative ribosomal function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 161.
- Klose, J. and Kobalz, U. 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis.* 16: 1034.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680.

- Lieberman, L. A. and Hunter, C. A. 2002. The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Int. Rev. Immunol.* 21: 373.
- Lindberg, R. E. and Frenkel, J. K. 1977. Toxoplasmosis in nude mice. *J. Parasitol.* 63: 219.
- Linder, P. and Slonimski, P. P. 1989. An essential yeast protein, encoded by duplicated genes TIF1 and TIF2 and homologous to the mammalian translation initiation factor eIF-4A, can suppress a mitochondrial missense mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 2286.
- Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N., and Sibley, L. D. 2002. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J. Biol. Chem.* 277: 25870.
- Manger, I. D., Hehl, A., Parmley, S., Sibley, L. D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R., and Boothroyd, J. C. 1998. Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect. Immun.* 66: 1632.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- McLeod, R., Estes, R. G., Mack, D. G., and Cohen, H. 1984. Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. *J. Infect. Dis.* 149: 234.
- Mehlhorn, H. and Walldorf, V. 1988. Life cycles. In: *Parasitology in Focus. Facts and Trends*. Mehlhorn, H. (ed.); Springer Verlag, Berlin: 1.
- Meissner, M., Schlüter, D., and Soldati, D. 2002. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science.* 298: 837.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., and Sibley, L. D. 1998a. The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J. Cell Sci.* 111: 2171.
- Mercier, C., Dubremetz, J. F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., and Cesbron-Delauw, M. F. 2002. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell.* 13: 2397.
- Mercier, C., Howe, D. K., Mordue, D., Lingnau, M., and Sibley, L. D. 1998b. Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect. Immun.* 66: 4176.

- Mercier, C., Lefebvre-Van Hende, S., Garber, G. E., Lecordier, L., Capron, A., and Cesbron-Delauw, M. F. 1996. Common cis-acting elements critical for the expression of several genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 21: 421.
- Mercier, C., Rauscher, B., Lecordier, L., Deslee, D., Dubremetz, J. F., and 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.
- Mineo, J. R., McLeod, R., Mack, D., Smith, J., Khan, I. A., Ely, K. H., and Kasper, L. H. 1993. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.* 150: 3951.
- Mordue, D. G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. A., and Sibley, L. D. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.* 167: 4574.
- Morgan, R. and Sargent, M. G. 1997. The role in neural patterning of translation initiation factor eIF4All; induction of neural fold genes. *Development.* 124: 2751.
- Morrisette, N. S. and Sibley, L. D. 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 21.
- Murray, H. W. and Cohn, Z. A. 1979. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 150: 938.
- Narasimhan, S., Armstrong, M. Y., Rhee, K., Edman, J. C., Richards, F. F., and Spicer, E. 1994. Gene for an extracellular matrix receptor protein from *Pneumocystis carinii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 7440.
- Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G., and Fischer, H. G. 2002. Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes. Infect.* 4: 581.
- Nicolle, C. and Manceaux, L. 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 147: 763.
- Nielsen, P. J. and Trachsel, H. 1988. The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J.* 7: 2097.
- Nischik, N., Schade, B., Dytnerka, K., Dlugonska, H., Reichmann, G., and Fischer, H. G. 2001. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is

- associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes. Infect.* 3: 689.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007.
- Parmley, S. F., Yang, S., Harth, G., Sibley, L. D., Sucharczuk, A., and 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.
- Pfefferkorn, E. R. 1990. Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In: *Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects*. Wyler D.J. (ed.), Freeman New York. 26.
- Pfefferkorn, E. R. and Pfefferkorn, L. C. 1976. *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp. Parasitol.* 39: 365.
- Pfefferkorn, E. R. and Pfefferkorn, L. C. 1977. Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J. Protozool.* 24: 449.
- Piechaczek, K., Dobrindt, U., Schierhorn, A., Fischer, G. S., Hecker, M., and Hacker, J. 2000. Influence of pathogenicity islands and the minor leuX-encoded tRNA^{5Leu} on the proteome pattern of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 75.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., and Lunardi, J. 1997. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 18: 307.
- Reichmann, G., Dlugonska, H., and 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.
- Reichmann, G., Dlugonska, H., Hyszczynska-Sawicka, E., and Fischer, H. 2001. Tachyzoite-specific isoform of *Toxoplasma gondii* lactate dehydrogenase is the target antigen of a murine CD4⁺ T-cell clone. *Microbes. Infect.* 3: 779.
- Richly, E. 2000. Klonierung und Charakterisierung eines vermutlich IL12-induzierenden Antigens von *Toxoplasma gondii*. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.

- Roberts, R. J. 1979. Directory of restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* 68: 27.
- Rogers, G. W., Jr., Komar, A. A., and Merrick, W. C. 2002. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72: 307.
- Roos, D. S., Donald, R. G., Morrissette, N. S., and Moulton, A. L. 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol.* 45: 27.
- Sabin, A. B. 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* 116: 801.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2:
- Sanford, K. K., Earle, W. R., and Likely, G. D. 1948. The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *Journal of the National Cancer Institute.* 9: 229.
- Scanga, C. A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E. Y., Medzhitov, R., and Sher, A. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168: 5997.
- Scharton-Kersten, T. M., Wynn, T. A., Denkers, E. Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R. T., and Sher, A. 1996. In the absence of endogenous IFN γ , mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J. Immunol.* 157: 4045.
- Scharton-Kersten, T. M., Yap, G., Magram, J., and Sher, A. 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 185: 1261.
- Schlüter, D., Lohler, J., Deckert, M., Hof, H., and Schwendemann, G. 1991. Toxoplasma encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of Toxoplasma antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. *J. Neuroimmunol.* 31: 185.
- Schmid, S. R. and Linder, P. 1991. Translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of residues conserved in the D-E-A-D family of RNA helicases. *Mol. Cell Biol.* 11: 3463.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., and 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.

- Sheffield, H. G. and Melton, M. L. 1968. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 54: 209.
- Sibley, L. D. and Boothroyd, J. C. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359: 82.
- Sibley, L. D., LeBlanc, A. J., Pfefferkorn, E. R., and Boothroyd, J. C. 1992. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics.* 132: 1003.
- Sibley, L. D., Mordue, D., and Howe, D. K. 1999a. Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. *Immunobiology.* 201: 210.
- Sibley, L. D., Mordue, D. G., Su, C., Robben, P. M., and Howe, D. K. 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 357: 81.
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F., and 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.
- Skeiky, Y. A., Guderian, J. A., Benson, D. R., Bacelar, O., Carvalho, E. M., Kubin, M., Badaro, R., Trinchieri, G., and Reed, S. G. 1995. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J. Exp. Med.* 181: 1527.
- Smith, J. E. 1995. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 25: 1301.
- Soete, M. and Dubremetz, J. F. 1996. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219: 76.
- Soldati, D., Dubremetz, J. F., and 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.
- Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N., and Sher, A. 1997. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186: 1819.
- Spano, F. and Crisanti, A. 2000. The initiation translation factor eIF-4A of *Cryptosporidium parvum* is encoded by two distinct mRNA forms and shows DNA

- sequence polymorphism distinguishing genotype 1 and 2 isolates. *J. Parasitol.* 86: 777.
- Springer, T. A. 1990. Leucocyte adhesion to cells. *Scand. J. Immunol.* 32: 211.
- Su, C., Evans, D., Cole, R. H., Kissinger, J. C., Ajioka, J. W., and Sibley, L. D. 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science.* 299: 414.
- Su, C., Howe, D. K., Dubey, J. P., Ajioka, J. W., and Sibley, L. D. 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10753.
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., and 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.
- Suzuki, Y. 2002. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 186 Suppl 2: S234.
- Svitkin, Y. V., Pause, A., Haghghat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G. J., and Sonenberg, N. 2001. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA.* 7: 382.
- Tato, C. M., Villarino, A., Caamano, J. H., Boothby, M., and Hunter, C. A. 2003. Inhibition of NF-kappa B activity in T and NK cells results in defective effector cell expansion and production of IFNgamma required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 170: 3139.
- Taylor, G. A., Collazo, C. M., Yap, G. S., Nguyen, K., Gregorio, T. A., Taylor, L. S., Eagleson, B., Secret, L., Southon, E. A., Reid, S. W., Tessarollo, L., Bray, M., McVicar, D. W., Komschlies, K. L., Young, H. A., Biron, C. A., Sher, A., and Vande Woude, G. F. 2000. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFNgamma-inducible gene IGTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 751.
- Tomavo, S. 2001. The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. *Int. J. Parasitol.* 31: 1023.
- Tomavo, S., Fortier, B., Soete, M., Ansel, C., Camus, D., and Dubremetz, J. F. 1991. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 59: 3750.

- Wassenaar, T. M. and Gaastra, W. 2001. Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol. Lett.* 9995: 1.
- Weiss, L. M. and Kim, K. 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 5: D391.
- Weiss, L. M., LaPlace, D., Tanowitz, H. B., and Wittner, M. 1992. Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 166: 213.
- Weiss, L. M., Ma, Y. F., Takvorian, P. M., Tanowitz, H. B., and Wittner, M. 1998. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. *Infect. Immun.* 66: 3295.
- Williams-Hill, D. M., Duncan, R. F., Nielsen, P. J., and Tahara, S. M. 1997. Differential expression of the murine eukaryotic translation initiation factor isoforms eIF4A(I) and eIF4A(II) is dependent upon cellular growth status. *Arch. Biochem. Biophys.* 338: 111.
- Winser, J., Verlinde, J. D., Van Thiel, P. H., Davel, J., and Van der Elst, P. 1948. Isolation of toxoplasma from cerebrospinal fluid of living infant in holland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67: 292.
- Yang, S. and Parmley, S. F. 1995. A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 291.
- Yap, G., Pesin, M., and Sher, A. 2000. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 165: 628.
- Zenner, L., Darcy, F., Capron, A., and 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.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

-/-	,knock out'
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
2D	zweidimensional
A	Adenosin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
aBK	attenuierte BK-Toxoplasmen
aBK ^{eIF4A+Myc}	eIF4A+Myc-exprimierende aBK-Toxoplasmen
aBK ^{LDH1+Myc}	LDH1+Myc-exprimierende aBK-Toxoplasmen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	,bradyzoite antigen'
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cat	Chloramphenicolacetyltransferase
CCR	,cystein-cystein chemokine receptor'
CD	,cluster of differentiation'
CHO	,chinese hamster ovary'
Ci	Curie
cpm	,counts per minute'
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochlorid hydrate
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytodintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotide
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
eIF	eukaryontischer Translationsinitiationsfaktor
ELISA	,enzyme linked immunosorbent assay'
ESI-MS/MS	,electrospray ionization tandem mass spectrometry'
EST	,expressed sequence tag'
FACS	,fluorescence-activated cell sorter'
FCS	Fötale Kälberserum

FITC	Fluorescein-isothiocyanate
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Guanosin
gDNA	genomische DNA
GRA	‚dense granule‘
griech.	griechisch
GSCN	Guanidinium-Isothiocyanat
GTP	Guanosintetraphosphat
HRP	Meerrettichperoxidase
HXGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN γ	Interferon- γ
IGTP	induzierbares GTP bindendes Protein
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare NO Synthase
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo (10^3)
ko	‚knock out‘
LD	letale Dosis
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
MAG	‚matrix antigen‘
MALDI-TOF	‚matrix assisted laser desorption ionisation time of flight‘
MHC	‚major histocompatibility complex‘
MIC	Micronemenprotein
min	Minute
ml	Milliliter
mu	murin
MyD	‚myeloid differentiation factor‘
n	Nano (10^{-9})
N	normal
ng	nanogramm
NK	natürliche Killer
NO	Stickstoffmonoxid
NS	Nukleinsäure
OD ₄₅₀	Optische Dichte 450 nm
ORF	offener Leserahmen
p	Pico (10^{-12})
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBS	‚phosphate buffered saline‘
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEC	Peritonealexsudatzellen
pmol	picomol pro Liter
PV	parasitophore Vakuole
r	rekombinant

RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROP	Rhoprienprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAG	‚surface antigen‘
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SSC	‚Sodium Saline Citrate‘
T	Thymidin
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
T _H 1	T-Helferzelle Typ 1
TLA	Toxoplasmalysat
TLR	‚toll-like receptor‘
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
vBK	virulentes BK-Isolat
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Fischer für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung sowie seine stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rolf Wagner danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich Heine-Universität.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fischer möchte ich dafür danken, dass ich die letzten drei Jahre in einem sehr guten Arbeitsklima verbringen konnte.

Weiterhin danke ich auch den anderen Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie für die gute Zusammenarbeit und den einen oder anderen guten Rat.

Frau Dr. Corinne Mercier danke ich herzlich für wertvolle Tipps bei der Herstellung des GRA7 ko's.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Hadding und Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer, die diese Arbeit beide großzügig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Ass. Prof. Dr. Boris Striepen und Herrn Dr. Marc-Jan Gubbels für die Einführung in die Geheimnisse der Transfektion von Toxoplasmen und für die gastfreundliche Aufnahme fern der Heimat.

Besonders danken möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden außerhalb des Labors, ohne deren Unterstützung und Rücksicht diese Arbeit wohl kaum möglich gewesen wäre.

Der größte Dank gebührt Alexandra Schwarzenberg, auf ihre Geduld und Verständnis konnte ich mich innerhalb und außerhalb des Labors immer rückhaltlos verlassen.

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 01. Mai 2003