

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

Direktor: Prof. Dr. K. Pfeffer

**Immunogenität des virulenzabhängig exprimierten
dense granule Proteins GRA7
von *Toxoplasma gondii***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nicole Nischik

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. med. dent Wolfgang H.M. Raab (Dekan)

Referent: Prof. Dr. Hans-Georg Fischer

Korreferentin: Prof. Dr. Helga Idel

Die in der vorliegenden Dissertation zusammengefassten Ergebnisse wurden von April 1997 bis Dezember 2000 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erarbeitet.

Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert:

Nischik, N., Schade, B., Dytnerka, K., Dlugonska, H., Reichmann, G. und 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 and Infection* (2001) 3, 1-11.

Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G. und Fischer, H.G. 2002. Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes and Infection* (2002) 4, 581-590.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 194/ Projekt B11 und Projekt Re 1334/1).

I.	Einleitung	5
1	Biologie von <i>Toxoplasma gondii</i>	5
1.1	Entwicklungszyklus	5
1.2	Morphologie	6
1.3	Wirtszellinvasion und intrazellulärer Parasitismus	8
2	Bedeutung von <i>Toxoplasma gondii</i> in der Medizin	9
2.1	Virulenz und Pathomechanismen	9
2.2	Klinische Manifestation der Toxoplasmose	11
2.3	Diagnose und Therapie der Toxoplasmose	12
3	Immunabwehr bei <i>Toxoplasma</i>-Infektion	13
3.1	Zellvermittelte Abwehr	14
3.2	Humorale Abwehr	15
3.3	Antigene von <i>Toxoplasma gondii</i>	16
4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	17
II.	Material und Methoden	18
1	Material	18
1.1	Geräte	18
1.2	Plastikwaren	19
1.3	Chemikalien	19
1.4	Lösungen für die Zellkultur	19
1.5	Antikörper	20
1.6	Software	21
2	Zelllinien und ihre Kultivierung	21
2.1	Fibroblasten	22
2.2	Plasmozytom	22
2.3	B-Zell-Hybridome	22
2.4	Kryokonservierung	22
3	Zellpräparationen	23
3.1	Mäuse	23
3.2	Milzzellen	23

3.3	Peritonealexsudat-Makrophagen.....	23
3.4	Gehirnzell-Primärkulturen.....	24
4	Toxoplasmen	25
4.1	Kultivierung und <i>in vivo</i> -Passage	25
4.2	Messung der Virulenz	26
4.3	Toxoplasmen-Proliferationstest.....	26
4.4	Mikroskopische Analyse der Infektion von Wirtszellen	26
5	Antigenpräparationen	27
5.1	Rekombinantes GRA7 und GRA7-Peptid.....	27
5.2	Herstellung von <i>Toxoplasma</i> -Lysaten	27
5.2.1	Lysat-Antigen (TLA).....	27
5.2.2	FrenchPress-Lysat (TFL).....	27
5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	27
6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
6.1	Eindimensionale SDS-PAGE	28
6.2	Zweidimensionale SDS-PAGE	29
6.3	Färbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel.....	30
6.3.1	Coomassie-Färbung.....	30
6.3.2	Imidazol-SDS-Zink-Färbung	30
7	Reinigung von GRA7	30
7.1	Immunoaffinitätschromatographie	30
7.2	Elektroelution aus SDS-Polyacrylamidgelen.....	31
8	Herstellung GRA7-spezifischer B-Zell-Hybridome.....	32
8.1	Immunisierung	32
8.2	Zellfusion	32
8.3	Selektion der Hybridome.....	33
8.4	Klonierung.....	34
8.5	Produktion von Hybridomkulturüberstand.....	34
8.6	Fällung von Immunglobulin	34
9	Methoden der Antigencharakterisierung.....	35
9.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	35
9.1.1	Isotypisierung monoklonaler Antikörper.....	35
9.1.2	Analyse von Antikörpertiter und Antigenzusammensetzung	35
9.2	Western Blot-Analyse.....	36

9.2.1	Proteintransfer auf Nitrozellulose.....	36
9.2.2	Immunchemischer Antigennachweis	37
9.2.3	Identifizierung von Antigenen in zweidimensionalen Gelen.....	37
9.3	Kartierung der Epitope monoklonaler Antikörper	38
10	Analyse der Aminosäuresequenz	38
11	Methoden zur Analyse der Immunantwort im Gehirn	39
11.1	Präparation von Liquor.....	39
11.2	Isolierung CD4-positiver Gehirnzellen	39
11.3	Analyse der Aktivierung CD4-positiver Gehirnzellen	40
11.3.1	Messung der Zellproliferation	40
11.3.2	Messung der Interferon- γ -Sekretion.....	40
III.	Ergebnisse	41
1	Nachweis einer GRA7-spezifischen Immunantwort in der chronischen Phase der Infektion	41
1.1	Nachweis <i>T. gondii</i> -reaktiver T-Zellen im Gehirn.....	41
1.2	Nachweis GRA7-spezifischer Antikörper im Liquor	42
2	Reinigung von GRA7 aus <i>Toxoplasma</i>-Lysat	43
2.1	Immunoaffinitätschromatographie	43
2.1.1	Optimierung der Antigen-Präparation	44
2.1.2	Reinigung des Antigens.....	45
2.2	Elektroelution von GRA7 aus SDS-Polyacrylamidgelen	47
3	Etablierung GRA7-spezifischer monoklonaler Antikörper	49
3.1	Reaktivität der Immunsereen	49
3.1.1	Antigenmuster im Western Blot	50
3.1.2	Antikörpertiter gegen TLA und GRA7	51
3.2	Reaktivität klonierter Hybridome.....	51
4	Charakterisierung der GRA7-spezifischen Antikörper TxE2, BATO214 und 5-241-178	53
4.1	Isotypen und Reaktivität gegenüber rekombinantem GRA7	53
4.2	Epitopsequenzen	54
4.3	Nachweis GRA7-Epitop-tragender Proteine im zweidimensional aufgetrennten <i>Toxoplasma</i> -Lysat.....	57

5	Attenuierung virulenter Toxoplasmen des Isolates BK durch Passage in Zellkulturen.....	58
5.1	Akute Virulenz in Mäusen.....	59
5.2	Infektion von Wirtszellen	61
5.2.1	Proliferation und Stoffwechselaktivität	61
5.2.2	Infektionsrate.....	63
5.3	Proteomvergleich	64
5.3.1	Eindimensionale Proteinauftrennung	64
5.3.2	Zweidimensionale Proteinauftrennung.....	65
5.4	Gehalt an <i>dense granule</i> Antigenen	67
5.5	GRA7-Antigenmuster in aBK und vBK Tachyzoiten	68
5.5.1	Antigenmuster im eindimensionalen Western Blot.....	68
5.5.2	Antigenmuster im zweidimensionalen Western Blot	69
IV.	Diskussion	72
1	GRA7 ist ein Zielantigen der intrazerebralen Immunantwort während der chronischen Infektion.....	72
2	GRA7 ist ein immundominantes B-Zell-Antigen	74
3	Langzeitkultivierung führt zur Attenuierung virulenter Toxoplasmen	76
4	<i>Dense granule</i> Proteine als putative Virulenzfaktoren	78
5	GRA7 ist ein Virulenz-assoziiertes Antigen	80
V.	Zusammenfassung.....	82
VI.	Literaturverzeichnis.....	83
VIII.	Abbildungsverzeichnis	93
IX.	Dank.....	94
X.	Erklärung.....	95

I. Einleitung

Toxoplasma gondii wurde erstmals 1908 aus dem meerschweinchenverwandten nordafrikanischen Nagetier Gundi (*Ctenodactylus gundi*) isoliert (Nicolle u. Manceaux 1908). Die aus nur einer Art bestehende Gattung *Toxoplasma* wird dem Stamm der Sporozoa (*Apicomplexa*), Unterklasse *Coccidia* zugeordnet, der als weitere medizinisch bedeutsame Vertreter die Erreger der Malaria (*Plasmodium*) und der Kryptosporidiose (*Cryptosporidium*) angehören. Das ausschließlich intrazellulär lebende Protozoon *T. gondii* ist in der Lage, praktisch alle warmblütigen Wirbeltiere zu infizieren, was in Verbindung mit der geringen Morbidität der Wirte zu seiner weltweiten Verbreitung beigetragen hat.

Bei der Toxoplasmose handelt es sich um die symptomatische Verlaufsform der sonst meist symptomlos verlaufenden *Toxoplasma*-Infektion, die insbesondere bei Neugeborenen und immunsupprimierten Wirten auftritt. In den letzten Jahren hat diese Erkrankung aufgrund der steigenden Zahlen immundefizienter AIDS-Patienten zunehmend an medizinischer Bedeutung gewonnen. In der Veterinärmedizin stehen durch *Toxoplasma*-Infektionen verursachte Aborte sowie die Identifizierung infizierter Nutztiere im Vordergrund.

1 Biologie von *Toxoplasma gondii*

1.1 Entwicklungszyklus

Der Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii* gliedert sich in eine enteroepitheliale, eine externe und eine extraintestinale Phase (Abbildung 1). Die Infektion erfolgt zumeist durch orale Aufnahme von zystenhaltigem Fleisch oder Oozysten mit fäkal kontaminierter Nahrung. Im Dünndarm werden die Toxoplasmen freigesetzt und infizieren die Enterozyten. Die enteroepitheliale Entwicklungsphase durchläuft der Parasit ausschließlich im Endwirt. Endwirte für *Toxoplasma gondii* sind Katzenartige (*Felidae*). Hier entwickeln sich über verschiedene ungeschlechtliche Stadien (Sporogonie), die Geschlechtsformen (Gamogonie). Noch innerhalb des Darmepithels fusionieren die Gameten zur Zygote, dem einzigen diploiden Entwicklungsstadium von *T. gondii*. Durch Ausbildung einer Zystenwand entstehen Oozysten, die ab dem 3.-14. Tag nach Infektion für eine Dauer von etwa 14 Tagen mit dem Kot ausgeschieden werden. Während der nun folgenden externen Phase entwickeln sich in den Oozysten innerhalb weniger Tage jeweils zwei Sporozysten mit je vier haploiden Sporozoiten (Sporulation). Erst nach Abschluß der Sporulation sind die Oozysten infektiös. Ihre Infektiosität bleibt aufgrund der außerordentlichen Widerstandsfähigkeit in feuchter Umgebung über Monate bis Jahre erhalten.

Die extraintestinale Entwicklung findet sowohl im Zwischenwirt als auch im Endwirt statt. In dieser Phase vermehren sich die Toxoplasmen ausschließlich ungeschlechtlich durch innere Zweiteilung (Endodyogenie). Innerhalb des Dünndarmepithels konvertiert der Parasit in das sich schnell replizierende Tachyzoitenstadium. Die Tachyzoiten verteilen sich über Blut und Lymphe im gesamten Organismus und vermehren sich im Zytoplasma kernhaltiger Wirtszellen. Bei Erstinfektion in der Schwangerschaft besteht die Gefahr der diaplazentaren Infektion des Fetus. In der akuten Phase der Infektion können Säuglinge über tachyzoitenhaltige Muttermilch infiziert werden. In der chronischen Phase der Infektion verlangsamt sich die Replikation der Parasiten. Aus Tachyzoiten entwickeln sich in intrazelluläre Gewebezysten eingeschlossene Bradyzoiten. Solche Zysten finden sich in zahlreichen Geweben, wo sie über viele Jahre persistieren ohne den immunkompetenten Wirt zu schädigen (Übersicht in: Dubey 1998^a, 1998^b).

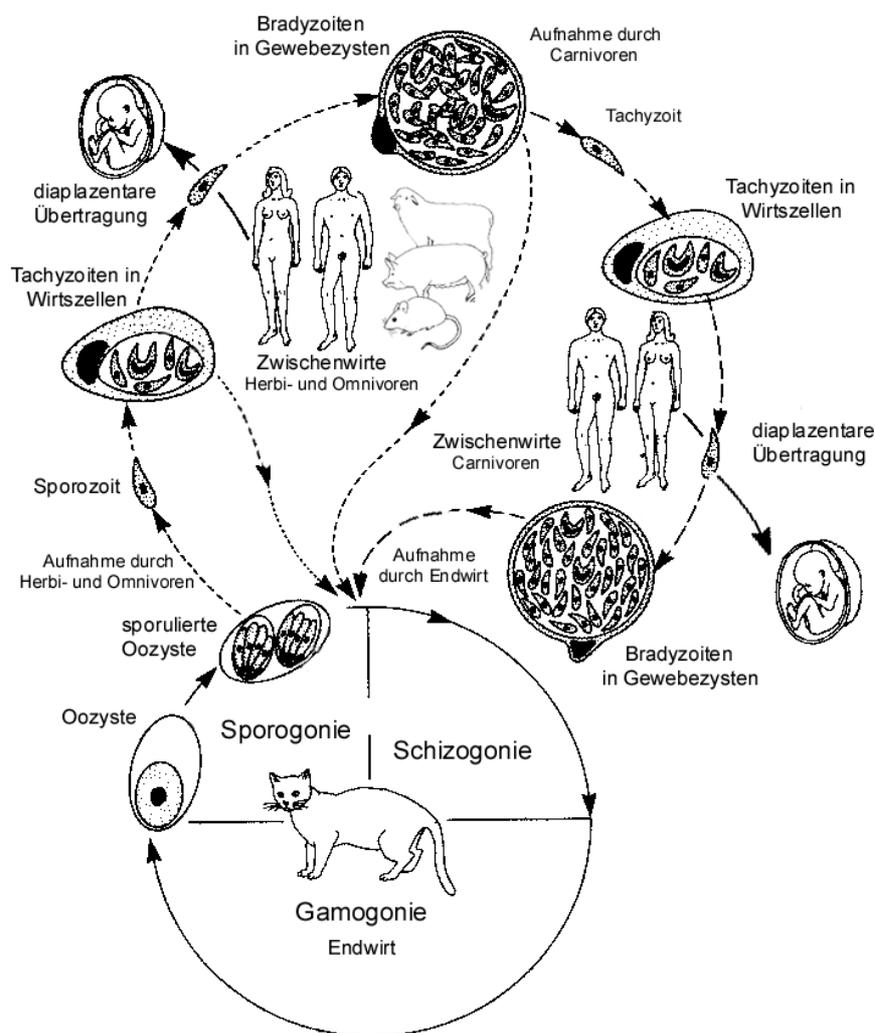


Abb. 1: Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

T. gondii vermehrt sich ausschließlich während der intestinalen Phase in seinen Endwirten geschlechtlich (Gamogonie). Die ungeschlechtliche Vermehrung findet in der externen Phase (Sporogonie) außerhalb eines Wirtes, und in der extraintestinalen Phase (Schizogonie) sowohl in Zwischen- als auch in den Endwirten statt. (Nach Mehlhorn u. Piekarski 1998).

1.2 Morphologie

Der Name *Toxoplasma* leitet sich von der gebogenen Gestalt (griechisch: toxon = Bogen, plasma = Form) des Tachyzoitenstadiums ab. Tachyzoiten besitzen eine Länge von durchschnittlich 6 µm und einen Durchmesser von etwa 2 µm. Die Toxoplasmenzelle wird von drei Membranen begrenzt. Das außen liegende Plasmalemma umgibt durchgehend die gesamte Zelle. Der aus einer Doppelmembran bestehende innere Membrankomplex besitzt drei Unterbrechungen, die den Stoffaustausch über Vesikel ermöglichen. Elektronendichte Membranverdickungen, sogenannte Polringe, bilden den Abschluß des inneren Membrankomplexes. Der anteriore Polring umgibt manschettenartig das Conoid. Dieser kegelförmige Hohlkörper besteht aus 6-8 Mikrotubuli und wird zur Penetration der Wirtszelle vorgestreckt

und gedreht. Der posteriore Polring umschließt eine exkretorische Pore. Die laterale Mikropore wird durch eine Einstülpung des Plasmalemma gebildet und dient der Nahrungsaufnahme. Unter der Pellikula ziehen 22 Mikrotubuli vom vorderen zum hinteren Polring. Innerhalb des Conoids münden zwei Mikrotubuli (Dobrowolski u. Sibley 1996).

Wie andere Apicomplexa enthält *T. gondii* neben dem Nukleus und dem Mitochondrium als drittes DNA-haltiges Organell ein Plastid (Apikoplast). Dieses von vier Membranen umgebene sekundär endosymbiontische Organell, dessen Funktion bisher noch nicht geklärt ist, ist Ziel der Wirkung verschiedener toxoplasmazider Antibiotika (Roos *et al.* 1999, McFadden u. Roos 1999).

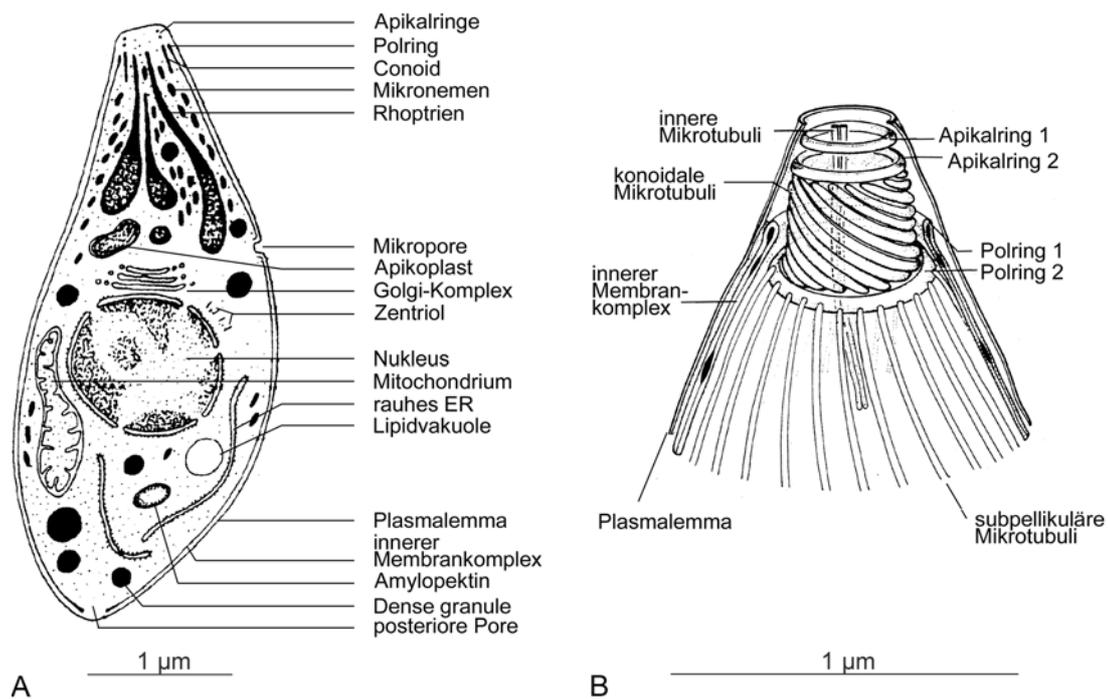


Abb. 2: Ultrastruktur eines Tachyzoiten

A: Schemazeichnung eines Tachyzoiten, B: Detailansicht des Apikalkomplexes (Nach Dubey *et al.* 1998^c)

Mit den Rhoptrien, den Mikronemen und den elektronendichten Granula bzw. *dense granules* verfügt *T. gondii* über drei verschiedene sekretorische Organellen. Die apikal gelegenen keulenförmigen Rhoptrien geben ihren Inhalt oberhalb des Conoids nach außen ab. Zwischen den Rhoptrien liegen die Mikronemen. Die *dense granules* sind im gesamten Zytoplasma des Parasiten verteilt und verschmelzen am apikalen Pol mit der Pellikula (Dubremetz *et al.* 1993). Etwa 10-20 min nach der Infektion der Wirtszelle erscheint am posterioren Pol eine Einstülpung der Pellikula, an der multi-lamellöse Vesikel und Membrantubuli sezerniert werden (Sibley *et al.* 1995). Diese Einstülpung ist 60 min nach der Infektion zurückgebildet. *Dense granule* Proteine wurden in multi-lamellösen Vesikeln und am inneren Membrankomplex nachgewiesen. Diese Topologie wurde als Hinweis auf einen neben der apikalen Verschmelzung existierenden alternativen Sekretionsweg der *dense granule* Proteine gedeutet (Labruyere *et al.* 1999, Bonhomme *et al.* 1998).

Das Conoid, der apikale Polring, die Rhoptrien und die Mikronemen bilden den für die Apicomplexa typischen Apikalkomplex, der entscheidend an der Wirtszellinvasion beteiligt ist. Die Funktionen der einzelnen Strukturen des Apikalkomplexes sind bisher nicht vollständig geklärt (Übersicht in: Dubey *et al.* 1998^b, 1998^c).

Verschiedene morphologische Kriterien ermöglichen die Unterscheidung der *Toxoplasma*-Stadien. Bradyzoiten besitzen einen nach posterior verlagerten Zellkern. Tachyzoiten enthalten im Vergleich zu Bradyzoiten viele *dense granules*, jedoch deutlich weniger Amylopektingranula und Mikronemen (Dubey *et al.* 1998^b, 1998^c).

1.3 Wirtszellinvasion und intrazellulärer Parasitismus

Die infektiösen Entwicklungsstadien von *T. gondii* (Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoiten) können sich in einer Vielzahl kernhaltiger Zelltypen verschiedenster warmblütiger Wirtsorganismen vermehren. Bei *Toxoplasma* und anderen Apicomplexa ist das Eindringen in die Zielzelle ein aktiver Prozeß (Übersicht in: Carruthers 2002). Wie Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren und Parasiten-Mutanten zeigten, ist die Invasion nicht abhängig von den Actinfilamenten der Wirtszelle, sondern von Actin- und Myosinfilamenten des Parasiten (Dobrowolski u. Sibley 1996, Dobrowolski *et al.* 1997).

Der Invasionsprozeß wird durch den primären Kontakt zwischen Parasit und Wirtszelle eingeleitet, an dem sowohl Moleküle der Wirtszelle, wie z.B. Laminin und Lektine, als auch parasitäre Proteine wie z.B. das Oberflächenantigen (*surface antigen*) SAG1 beteiligt sind (Dubey *et al.* 1998^c). Zu Beginn der Invasion wird das Conoid vorgestreckt. Während der Parasit sich mit seinem apikalen Pol an die Zielzelle anlagert, werden aus den Mikronemen Proteine (MIC) freigesetzt, die die Adhäsion des Parasiten an die Wirtszelle vermitteln. Im Bereich dieser Kontaktzone entsteht eine enge Verbindung (*moving junction*) zwischen der Pellikula des Parasiten und der Membran der Wirtszelle. An dieser Stelle dringt der Parasit mit schraubenförmigen Bewegungen in die Wirtszelle ein. Dabei wird die Wirtszellmembran nach innen gestülpt und zur Bildung der neu entstehenden parasitophoren Vakuole (PV) genutzt. Die *moving junction* gleitet währenddessen zum posterioren Pol des Parasiten. Lipide und über Glycosylphosphatidylinositol verankerte Proteine der Wirtszellmembran werden in die Membran der PV (PVM) integriert, Transmembrane Oberflächenproteine werden jedoch durch die *moving junction* zurückgehalten. Unmittelbar nach der Sekretion von MIC Proteinen werden Rhoptrienproteine (ROP) in die entstehende PV sezerniert (Mordue *et al.* 1999^a). Nach 20-30 sec ist der Parasit vollständig in die Wirtszelle eingedrungen.

Nach der Invasion in die Wirtszelle schnürt sich die PV von der Wirtszellmembran ab. Dann beginnt eine verstärkte Sekretion von *dense granule* Proteinen (GRA) in das Lumen der PV, die nach etwa 20 min ihren Höhepunkt erreicht. Im Gegensatz zu den Proteinen aus Mikronemen und Rhoptrien werden die Proteine der *dense granules* in geringer Menge während der gesamten intrazellulären Entwicklung sezerniert (Dubremetz *et al.* 1998). Im Verlauf der Entwicklung werden sowohl die PV als auch die sie begrenzende Membran durch sekretorische Produkte der Toxoplasmen modifiziert. Kurze Zeit nach Abschluß der Invasion werden, ausgehend von einer transienten Einstülpung des posterioren Pols, Tubuli und multi-lamellöse Vesikel in die PV abgegeben. Innerhalb der PV bildet sich daraus das tubulovesikuläre Netzwerk, dessen Tubuli z.T. mit der PVM verbunden sind und durch ihre Öffnung zum Wirtszellzytoplasma die Oberfläche der PV vergrößern (Sibley *et al.* 1995). Das präzise Zusammenspiel der Sekretion von Mikronemen, Rhoptrien und *dense granules* führte zu der Schlußfolgerung, dass die Proteine der Mikronemen Funktionen bei der Adhäsion und Invasion erfüllen, und dass die Proteine der Rhoptrien an der Bildung der PV beteiligt sind.

Die Funktionen der *dense granule* Proteine sind, abgesehen von der enzymatischen Aktivität einer Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPase) und einer sauren Phosphatase, weitgehend unbekannt. Es gibt Hinweise dafür, dass sie die PV für die Aufnahme wirtszelleigener Nährstoffe modifizieren (Übersicht in: Morrissette u. Sibley 2002, Carruthers 2002).

Toxoplasmen sind von der exogenen Zufuhr von Purinen und Tryptophan abhängig. Da sie in der PV eingeschlossen sind, können sie sich den Stoffwechsel der Wirtszelle nicht uneingeschränkt zu Nutze machen. Die Mechanismen des Stoffaustausches durch die PVM sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird diskutiert, dass mit dem tubulovesikulären Netzwerk assoziierte Proteine daran beteiligt sind. Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1200 Da gelangen passiv durch die PVM (Schwab *et al.* 1994). Ein Import von Lipiden oder Proteinen der Wirtszelle konnte bisher ebensowenig nachgewiesen werden wie eine Fusion der PVM mit endo- oder exozytotischen Vesikeln der Wirtszelle (Mordue *et al.* 1999^b).

Innerhalb der PV teilen sich Tachyzoiten alle 5-9 h. Nach etwa 2 Tagen werden die Tachyzoiten aus der Wirtszelle freigesetzt. Unklar ist bisher, ob die Parasiten durch mechanische Ruptur der Wirtszelle oder durch biochemische Mechanismen freigesetzt werden. Zeitgleich mit dem Einsetzen der spezifischen Immunabwehr des Wirtes wird die intrazelluläre Vermehrung der Parasiten gebremst. Die Parasiten durchlaufen eine Stadienkonversion, in deren Verlauf sich Tachyzoiten zu Bradyzoiten entwickeln. Dabei wird die PVM in eine widerstandsfähige Zystenwand umgewandelt. In der Zellkultur kann eine solche Stadienkonversion spontan ablaufen oder z.B. durch Zugabe von Interferon- γ oder *T. gondii*-spezifischen Antisera, sowie durch Veränderung des pH-Wertes oder der Temperatur ausgelöst werden (Übersicht in: Carruthers 2002, Dubey *et al.* 1998^c).

2 Bedeutung von *Toxoplasma gondii* in der Medizin

Ein breites Wirtsspektrum, hohe Infektionsraten und eine benigne Co-Existenz mit dem Wirtsorganismus gehören zu den Merkmalen eines erfolgreichen Parasiten. Im Gegensatz zu vielen anderen Parasiten können Toxoplasmen auch außerhalb tropischer oder subtropischer Klimaverhältnisse überleben. Sie weisen ein Wirtsspektrum auf, das praktisch alle warmblütigen Tiere und den Menschen umfasst. *Toxoplasma gondii* gehört zu den in der Weltbevölkerung am weitesten verbreiteten Parasiten. Die Häufigkeit von *Toxoplasma*-Infektionen unterliegt regionalen Schwankungen. Innerhalb Kontinentaleuropas liegt die Prävalenzrate bei 50-80 %, in den USA und in Großbritannien bei 16-40 % (Dubey u. Beatty 1988, Dubey 1998^b). In Deutschland sind bei etwa 60 % der Erwachsenen Antikörper gegen *T. gondii* nachweisbar (Lucius u. Loos-Frank 1997). Die Ursachen dieser unterschiedlichen Durchseuchungsraten sind bisher nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden u.a. ernährungsbedingte Einflüsse wie z.B. der Verzehr von rohem Fleisch und umweltbedingte Faktoren wie z.B. die regionale Fauna (Übersicht in: Carruthers 2002, Dubey 1998^b).

2.1 Virulenz und Pathomechanismen

Der Verlauf einer *Toxoplasma*-Infektion wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dazu gehören die Virulenz des Parasiten, genetische Faktoren sowie der Immunstatus des Wirtsorganismus. *Toxoplasma gondii*-Isolate werden anhand von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen und Isoenzym-Analysen in drei klonale Subtypen klassifiziert (Sibley u. Boothroyd 1992, Cristina *et al.* 1995). Isolate der drei Subtypen unterscheiden sich in erster Linie in der Virulenz in Mäusen. Subtyp I-Isolate werden zunehmend aus Patienten

mit schweren Krankheitsverläufen z.B. bei konnataler oder AIDS-assoziiierter Toxoplasmose isoliert. Eine experimentelle Infektion mit je einem einzelnen Parasiten führt in Mäusen, unabhängig vom Genotyp der Tiere, innerhalb von 14 Tagen zum Tod. Subtyp II- und Subtyp III-Isolate sind relativ avirulent. Die Infektionsdosis, bei der 50 % der infizierten Mäuse innerhalb von 14 Tagen sterben, liegt hier bei 10^3 - 10^5 Toxoplasmen. Diese Isolate etablieren durch Bildung zahlreicher Gewebezysten chronische Infektionen in Mensch und Tier. Aus Menschen und Nutztieren werden am häufigsten Subtyp II-Toxoplasmen isoliert. Subtyp III-Isolate sind bei Menschen eher selten anzutreffen. Sie werden häufiger aus Tieren isoliert, die seltener der menschlichen Ernährung dienen, wie z.B. Vögel, Katzen und Nagetiere. Isolate der Subtypen II und III vermehren sich in Zellkulturen deutlich langsamer als Subtyp I-Isolate. Innerhalb des Wirtsorganismus verbreiten sich virulente und avirulente Toxoplasmen gleich schnell. Die im Gewebe nachweisbare Parasitenzahl ist jedoch bei einer Infektion mit virulenten Toxoplasmen deutlich höher.

Trotz extremer Unterschiede in der Virulenz zeigen die verschiedenen *Toxoplasma*-Subtypen nur geringe genetische Unterschiede. In zahlreichen Loci sind Isolate aller drei Subtypen zu 98 % identisch. So konnten z.B. lediglich zwei unterschiedliche Allele des Gens identifiziert werden, das für das Hauptoberflächenprotein SAG1 der Tachyzoiten codiert. Es gibt Hinweise dafür, dass diese geringen genetischen Unterschiede für die Regulation der Virulenz verantwortlich sind. *Toxoplasma* besitzt neun Chromosomen. In der Nachbarschaft des für SAG1 codierenden Gens auf Chromosom 8 konnten Virulenz-assoziierte Gene lokalisiert werden, jedoch ist die Funktion der von ihnen codierten Proteine bisher noch nicht bekannt (Übersicht in: Sibley *et al.* 1999). Mit der Virulenz eng assoziiert ist auch das *dense granule* Protein GRA2. Die Infektion mit einer GRA2-defizienten Mutante eines Subtyp I-Isolates überlebte etwa die Hälfte der Mäuse, die Infektion mit dem Wildtyp nur etwa ein Viertel (Mercier *et al.* 1998). Eine Infektion mit *Toxoplasma*-Mutanten, die nicht das Oberflächenantigen SAG3 exprimieren, resultiert ebenfalls in einer deutlich reduzierten Mortalität der Mäuse. *In vitro* zeigen diese attenuierten Mutanten eine reduzierte Fähigkeit zur Wirtszellinvasion (Dzierszinski *et al.* 2000).

Der Begriff der Virulenz ist, im Falle von *T. gondii*, über den Verlauf einer experimentellen Infektion in Mäusen definiert. Innerhalb verschiedener Maus-Inzuchtstämme gibt es Unterschiede im Infektionsverlauf. Suszeptible Mäuse sterben nach Infektion mit avirulenten Isolaten meist in der akuten Phase der Infektion, jedoch spätestens an den Folgen der chronischen Toxoplasmose. Bei resistenten Mäusen hingegen entwickelt sich, ähnlich wie beim Menschen, eine chronisch-latente Infektion. Bei Mäusen ist die den Tumornekrosefaktor- α -Locus einschließende H-2D-Region im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) mit der Resistenz assoziiert. Auch beim Menschen konnte eine genetische Prädisposition gezeigt werden. Untersuchungen an AIDS-Patienten zeigten einen Einfluß von HLA-DQ Genen auf die Entwicklung einer *Toxoplasma*-Enzephalitis. Dabei scheint das HLA-DQ3 Allel ein genetischer Marker für erhöhte Suszeptibilität zu sein (Übersicht in: Suzuki 1999).

Während einer Infektion mit *T. gondii* wird der Wirtsorganismus durch parasitäre und wirtseigene Pathomechanismen geschädigt. Dabei ist das Ausmaß der Schädigung entscheidend von der Immunabwehr des Wirtes abhängig. In immunkompetenten Wirten wird die Vermehrung der Parasiten durch zelluläre Abwehrmechanismen rasch eingedämmt. Durch Ausbildung intrazellulärer Ruhestadien entwickelt sich eine chronisch-latente Infektion. Bei geschwächter zellulärer Immunabwehr kann das Parasitenwachstum nicht ausreichend kontrolliert werden, es kommt zur Reaktivierung chronisch latenter Infektionen mit ungehemmter Vermehrung der Toxoplasmen, die sich besonders gravierend innerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) auswirkt (Connor *et al.* 1997).

In Mäusen wurde nachgewiesen, dass letale Infektionen mit Subtyp I-Isolaten nicht allein auf die direkte Zerstörung der Gewebe durch die Parasiten zurückzuführen sind. Untersuchungen von Lebergewebe letal infizierter Mäuse zeigten eine ausgeprägte Schädigung nicht infizierter Leberzellen. Es wird diskutiert, dass solche Gewebeschäden durch lösliche parasitäre Faktoren oder durch induzierte wirtseigene Faktoren vermittelt werden könnten. Auch in den lymphatischen Geweben letal infizierter Mäuse wurde eine ausgedehnte Nekrose bzw. Apoptose nicht infizierter Zellen beobachtet (Mordue *et al.* 2001). Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass Toxoplasmen die Apoptose ihrer direkten Wirtszellen hemmen (Nash *et al.* 1998). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass *T. gondii* seine direkten Wirtszellen vor Apoptose schützt, jedoch bei nicht infizierten Zellen den Zelltod induziert.

2.2 Klinische Manifestation der Toxoplasmose

Eine Infektion mit *T. gondii* verläuft bei immunkompetenten Menschen meist symptomlos. Seltener treten nach einer Inkubationszeit von 1-3 Wochen unspezifische Symptome wie Fieber, Mattigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen auf (Toxoplasmose). Die häufigste Organmanifestation ist die zervikale Lymphknoten-Toxoplasmose. Nur in sehr seltenen Fällen entwickelt sich, dann insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, eine Meningoenzephalomyelitis. Nicht selten hingegen ist die *Toxoplasma*-Retinochoroiditis, ein Krankheitsbild, das unbehandelt zur Erblindung führen kann (Roberts u. McLeod 1999). Das Immunsystem des gesunden Menschen kontrolliert die Ausbreitung der Toxoplasmen, es ist jedoch nicht in der Lage, sie vollständig zu eliminieren. Der Parasit bildet intrazelluläre Zysten, die über einen unbestimmten Zeitraum in ZNS, Muskulatur und zahlreichen anderen Geweben persistieren, ohne den Infizierten merklich zu schädigen. Mit zunehmendem Alter steigt daher die Prävalenzrate in der Bevölkerung. Bei experimentell mit *Toxoplasma* infizierten Nagetieren wurden Verhaltensänderungen beobachtet und auch bei infizierten Menschen wurden Veränderungen der Psyche und des Verhaltens beschrieben. Ein Zusammenhang von *Toxoplasma*-Infektion und Schizophrenie wird derzeit diskutiert (Übersicht in: Carruthers 2002).

Ist das Immunsystem noch nicht ausgereift oder stark geschwächt, kann eine Infektion mit *T. gondii* lebensbedrohend verlaufen. Dies gilt insbesondere für konnatale Infektionen und Infektionen immunkompromittierter Patienten. Infiziert sich eine Frau erstmals in der Schwangerschaft, breiten sich die Parasiten über Blut und Lymphe im gesamten Organismus aus und werden in etwa 40 % der Fälle diaplazentar auf den Fetus übertragen. Die Wahrscheinlichkeit einer intrauterinen Infektion ist ebenso wie das Ausmaß der fetalen Schädigung entscheidend abhängig vom Zeitpunkt der Infektion. Das Übertragungsrisiko ist zu Beginn der Schwangerschaft geringer und nimmt bis zum Ende zu. Vor der 20. Schwangerschaftswoche kann eine Infektion sowohl zum Abort als auch zu schwerwiegenden kindlichen Fehlbildungen führen. Bei späteren Infektionen ist das Ausmaß der Veränderungen geringer. Insgesamt zeigen etwa 90 % der Fälle von konnataler Toxoplasmose einen subklinischen Verlauf. Hierbei manifestiert sich die Erkrankung meist im Bereich des ZNS. Die Kinder werden erst im Verlauf ihrer Entwicklung u.a. durch psychomotorische Retardierung, Krampfanfälle, Blindheit und Taubheit auffällig. Zur klassischen Symptomtrias der konnatalen Toxoplasmose gehören Chorioretinitis, *Hydrocephalus internus* und periventrikuläre Verkalkungen. Akut gefährdet sind Neugeborene mit einer generalisierten Infektion, bei der das ZNS und die viszerale Organe befallen sind. Die schwer erkrankten Kinder leiden u.a. an Hepatosplenomegalie, Pneumonie, Myokarditis und Anämie (Übersicht in: Remington *et al.* 1995). Erkrankung und Todesfälle infolge kongenitaler Toxoplasmose sind meldepflichtig.

In den letzten Jahren hat die Toxoplasmose durch die stetig wachsende Anzahl immun-kompromittierter Patienten an Bedeutung gewonnen (Hunter u. Remington 1994). Ein durch AIDS oder immunsuppressive Therapie stark geschwächtes Immunsystem ist nicht mehr in der Lage, eine *Toxoplasma*-Infektion ausreichend zu kontrollieren. Solche Patienten sind nicht nur durch eine Neuinfektion gefährdet. Häufig kommt es zur Reaktivierung einer chronisch-inapparenten Infektion. Die Toxoplasmose ist eine der bedeutendsten AIDS-definierenden opportunistischen Erkrankungen und eine der häufigsten Todesursachen bei AIDS-Patienten. Ohne prophylaktische Antibiotikatherapie entwickeln etwa 30 % der *Toxoplasma*-seropositiven AIDS-Patienten eine *Toxoplasma*-Enzephalitis. Das klinische Bild der *Toxoplasma*-Enzephalitis ist vielseitig und reicht von Kopfschmerzen, Verwirrheitszuständen, Krampfanfällen und Sensibilitätsstörungen bis hin zur Hemiparese. Pneumonien und Myokarditiden bis hin zu disseminierten Infektionen sind weitere lebensbedrohende Manifestationsformen innerhalb dieses Patientenkollektivs (Arnold *et al.* 1997). Im Jahre 1992 wurde bei 9.3 % der verstorbenen AIDS-Patienten in den USA eine zerebrale Toxoplasmose diagnostiziert. Durch den prophylaktischen und therapeutischen Einsatz von Antibiotika sank der Prozentanteil 1997 auf 5.7 % (Jones *et al.* 1999).

2.3 Diagnose und Therapie der Toxoplasmose

Die Diagnostik der Toxoplasmose erfolgt vorwiegend serologisch über den Nachweis parasitenspezifischer Antikörper. Beim klassischen Sabin-Feldmann-Test führt die Bindung spezifischer Serumantikörper zum Verlust der Anfärbbarkeit vitaler Toxoplasmen mit Methylenblau. In den meisten Labors wird dieser sehr spezifische und sensitive Test wegen des notwendigen Umgangs mit lebenden Parasiten nicht mehr routinemäßig durchgeführt. Eine kürzlich neu entwickelte Testvariante, bei der die Komplement-vermittelte Lyse transgener, β -Galactosidase exprimierender Tachyzoiten colorimetrisch statt visuell erfaßt wird, könnte sich als vielversprechende Alternative erweisen (Dando *et al.* 2001). Für die Routinediagnostik stehen heute weitere sensible Nachweisverfahren wie z.B. der indirekte Immunfluoreszenztest, die Komplementbindungsreaktion, der direkte Agglutinationstest, der *immunosorbent agglutination assay* sowie verschiedene Varianten des *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) zur Verfügung. Dabei ist die Unterscheidung von akuter und chronischer Infektion anhand der im Serum auftretenden Immunglobulinklassen (IgM, IgG, IgA) besonders bei der Schwangerenvorsorge und der serologischen Überwachung immunsupprimierter Patienten von ausschlaggebender Bedeutung. Hohe IgM-Titer, bei steigenden IgG-Titern, sind Zeichen einer akuten Infektion. Hohe IgG-Titer, bei niedrigen IgM-Titern, sprechen für eine chronische Infektion (Mehlhorn *et al.* 1995).

Eine Isolierung von Toxoplasmen aus Patientenmaterial mit Hilfe von Zellkulturen oder im Tierversuch ist möglich, aber aufgrund der invasiven Probengewinnung (z.B. Biopsien aus Lymphknoten, Muskulatur, Gehirn) nur selten indiziert. Bei immundefizienten Patienten sind serologische Verfahren nur eingeschränkt aussagekräftig. Bei diesen Patienten stehen z.B. bei der Diagnostik der *Toxoplasma*-Enzephalitis die klinische Symptomatik und radiologische Befunde im Computer- oder Kernspintomogramm im Vordergrund. Da anhand der klassischen serologischen Tests nicht zwischen einer latenten asymptomatischen Infektion und einer reaktivierten Toxoplasmose unterschieden werden kann, liefert häufig der Erfolg der eingeleiteten Antibiotikatherapie eine weitere Bestätigung der Diagnose (Contini *et al.* 1998). Bei 15-20 % der AIDS-Patienten sind trotz bestätigter *Toxoplasma*-Infektion keine spezifischen Antikörper im Serum nachweisbar (Porter u. Sande 1992). In solchen Fällen, oder auch bei Therapieversagen, kann eine Probiopsie erforderlich werden. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde bisher mit unterschiedlichem Erfolg zum

Nachweis *Toxoplasma*-spezifischer DNA in histologischen Schnitten, Liquor oder Amnionflüssigkeit eingesetzt.

Behandlungsbedürftig sind in erster Linie Infektionen immunsupprimierter Patienten, Erstinfektionen Schwangerer sowie die konnatal erworbene Toxoplasmose. Da *Toxoplasma*-Infektionen bei immunkompetenten Personen meist latent und selbstlimitierend verlaufen, ist eine Therapie nur bei symptomatischem Verlauf indiziert. Die Standardtherapie der Toxoplasmose besteht in einer Kombination aus Pyrimethamin und einem Sulfonamid (z.B. Sulfadiazin). Diese Substanzen hemmen an verschiedenen Angriffspunkten synergistisch die Folsäurebiosynthese der sich teilenden Tachyzoiten, sie wirken jedoch nicht gegen enzystierte Bradyzoiten.

Bei der Therapie der *Toxoplasma*-Enzephalitis werden alternativ die Makrolide Azithromycin, Spiramycin und Clarithromycin sowie das Lincosamid Clindamycin als Monotherapie oder in Kombination mit Pyrimethamin verwendet. Diese Substanzen inhibieren die Proteinbiosynthese der Parasiten (Rosenblatt 1999, Mutschler 1996). Eine vollständige Elimination der Toxoplasmen ist trotz verschiedenster chemotherapeutischer Ansätze bisher nicht möglich, da die z.Z. verwendeten Antibiotika keine oder nur geringe zystizide Wirkung besitzen (Dubey 1998^b). Bei immunsupprimierten Patienten mit positiver Serologie und weniger als 200 T-Helferzellen/ μ l Blut ist daher eine prophylaktische Gabe von Antibiotika sinnvoll um eine Reaktivierung zu vermeiden. Eine Rezidivprophylaxe nach *Toxoplasma*-Enzephalitis sollte dauerhaft durchgeführt werden. Dabei können die myelotoxischen Nebenwirkungen von Pyrimethamin durch Gabe von Folsäure vermindert werden. In den letzten Jahren wurde Atovaquon, ein Inhibitor der Nukleinsäure- und ATP-Synthese, mit Erfolg bei der Therapie der *Toxoplasma*-Enzephalitis eingesetzt (Simon u. Stille 2000).

Durch eine Kombinationstherapie mit Atovaquon und Clindamycin oder IL-12 konnte bei Mäusen mit akuter Toxoplasmose die Überlebensrate gesteigert werden. Bei einem Teil der überlebenden Tiere, die mit Atovaquon und Clindamycin behandelt worden waren wurde eine vollständige Eliminierung der Parasiten beobachtet (Araujo *et al.* 1997, Djurković-Djavić 1999).

Akute Infektionen werden bei Schwangeren in der Regel mit Spiramycin behandelt. Diese Substanz erreicht hohe Konzentrationen im Plazentagewebe, passiert jedoch nicht die Plazentaschranke und reduziert somit die diaplazentare Übertragungsrate um bis zu 60 %. Wegen des teratogenen Potentials der Folsäureantagonisten darf eine intrauterine Infektion erst nach der 16. Schwangerschaftswoche mit Pyrimethamin und einem Sulfonamid behandelt werden (Rosenblatt 1999). Zur Vermeidung von Folgeschäden sollte eine konnatale Toxoplasmose auch bei subklinischem Verlauf therapiert werden.

Bisher gibt es für den Menschen noch keinen Impfstoff gegen die Toxoplasmose. Daher haben hygienische Maßnahmen, z.B. der Verzicht auf den Verzehr nicht ausreichend erhitzten Fleisches (auch für Hauskatzen) oder die Vermeidung des Kontaktes von Schwangeren zu Katzen, eine besondere Bedeutung bei der Prophylaxe. Zudem ist die serologische Überwachung von Schwangeren und Immunsupprimierten wichtig.

3 Immunabwehr bei *Toxoplasma*-Infektion

Eine *Toxoplasma*-Infektion löst in einem gesunden Wirtsorganismus eine komplexe humorale und zelluläre Immunantwort aus. Die effektive Kontrolle der Infektion erfolgt in erster Linie durch die zellvermittelte Abwehr. Aufgrund ihrer intrazellulären Lebensweise sind die Parasiten der humoralen Abwehr nur eingeschränkt zugänglich. Die entscheidende Rolle der

zellvermittelten Immunabwehr wird besonders deutlich am Beispiel *Toxoplasma*-infizierter AIDS-Patienten, bei denen eine Abnahme der peripheren T-Lymphozytenzahl eng mit der Entwicklung einer *Toxoplasma*-Enzephalitis korreliert.

3.1 Zellvermittelte Abwehr

Zu Beginn einer Primärinfektion mit Toxoplasmen werden zunächst die unspezifischen Abwehrmechanismen der angeborenen Immunabwehr aktiviert, an der primär Dendritische Zellen, Makrophagen und infizierte Wirtszellen beteiligt sind. Diese Mechanismen begrenzen einerseits die Ausbreitung der Parasiten und leiten andererseits die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort ein.

Nach oraler Infektion mit Zysten treffen die im Dünndarm freigesetzten Toxoplasmen innerhalb des Dünndarmepithels auf Makrophagen und in den Peyerschen Plaques auf Dendritische Zellen (Übersicht in: Liesenfeld 1999). Dendritische Zellen werden sowohl durch eine Infektion mit Toxoplasmen als auch durch Kontakt mit löslichen *Toxoplasma*-Extrakten zur Sekretion des Zytokins Interleukin-12 (IL-12) stimuliert (Reis e Sousa *et al.* 1997). IL-12 ist der Schlüsselmediator bei der Auslösung zellulärer Immunreaktionen. Auch Makrophagen sezernieren nach Interaktion mit Toxoplasmen oder deren Proteinen IL-12. Synergistisch mit den ebenfalls von aktivierten Makrophagen sezernierten Mediatoren IL-1 β und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) aktiviert IL-12 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zur Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ). Durch IFN- γ werden in Makrophagen verschiedene zytotoxische und zytostatische Effektormechanismen aktiviert. Zudem verstärkt das Zytokin die Expression von MHC Klasse II Molekülen und damit die Antigenpräsentationsleistung der Makrophagen.

In humanen und murinen Makrophagen stimuliert IFN- γ den oxidativen Metabolismus. Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Superoxid (O₂⁻) oder Hydroxylradikale (OH \cdot) haben eine toxoplasmazide Wirkung. Toxoplasmen sind jedoch in der Lage, Radikal-neutralisierende Enzyme zu produzieren und wirken so diesem Teil der antiparasitären Abwehr entgegen. In verschiedenen humanen Zelltypen wie Monozyten, Astrozyten und Fibroblasten, jedoch nicht in murinen Makrophagen, induziert IFN- γ den Abbau von L-Tryptophan durch das Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO). Der Entzug dieser essentiellen Aminosäure hemmt das intrazelluläre Wachstum von Toxoplasmen. In murinen Makrophagen ist die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) ein bedeutender antimikrobieller Effektormechanismus. Induktoren der iNOS sind z.B. IFN- γ , TNF- α , IL-1 und LPS. Neben der antiparasitären Wirkung hat NO durch die Hemmung der T-Zell-Proliferation auch einen immunregulatorischen Effekt. Anders als in murinen Makrophagen scheint die Produktion von NO in humanen Makrophagen und Monozyten keine wesentliche Rolle bei der Abwehr von Toxoplasmen zu spielen (Übersicht in: Däubener u. Hadding 1997).

Erst die spezifische Immunantwort ist in der Lage, die Infektion zu kontrollieren. In den regionären Lymphknoten präsentieren die professionell antigenpräsentierenden Makrophagen und Dendritischen Zellen *Toxoplasma*-Antigene und stimulieren damit T-Zellen. Die so induzierte antigenspezifische Immunantwort durch T- und B-Lymphozyten wird nach etwa fünf Tagen wirksam. Unter dem Einfluß von IL-12 und IFN- γ wird eine für die Abwehr intrazellulärer Erreger typische, sogenannte Typ1-Antwort induziert. Der Schutz susceptibler Mäuse vor einer letalen *Toxoplasma*-Infektion durch adoptiven Transfer *Toxoplasma*-spezifischer T-Zellen lieferte erste Hinweise auf die zentrale Bedeutung von T-Zellen bei der Abwehr einer *Toxoplasma*-Infektion. Durch *in vivo*-Depletion einzelner T-Zell-Subpopulationen wurde eine synergistische Funktion von CD4- und CD8-positiven T-Zellen gezeigt.

Während CD8-positive T-Lymphozyten als Haupteffektorzellen gelten, wird den CD4-positiven T-Lymphozyten eine eher regulatorische Funktion bei der Etablierung und Erhaltung der spezifischen Immunabwehr zugeordnet. Die Tatsache, dass eine Behandlung mit Antikörpern gegen den CD4-Rezeptor während der Vakzination mit attenuierten Toxoplasmen nicht zur Entwicklung einer protektiven Immunität führt, unterstützt dieses Konzept ebenso wie die Erkenntnis, dass der adoptive Transfer *Toxoplasma*-immuner CD8-Zellen in naive Mäuse allein keinen Schutz vor einer letalen Infektion bietet (Denkers 1999). Beide T-Zell-Populationen zeigen eine MHC-restringierte zytolytische Aktivität gegenüber infizierten Wirtszellen. Dabei freigesetzte Toxoplasmen sind jedoch vital und können weitere Wirtszellen infizieren. Es wird vermutet, dass durch die zellvermittelte Zytolyse freigesetzte Toxoplasmen leichter durch humorale Abwehrmechanismen erfasst werden können. Ein durch CD8-positive Zellen vermittelter Schutzmechanismus ist die MHC-unabhängige Lyse extrazellulärer Tachyzoiten. Der entscheidende Effektormechanismus der T-Zell-vermittelten Immunabwehr ist jedoch die Sekretion von Zytokinen, insbesondere von IFN- γ (Übersichten in: Däubener u. Hadding 1997, Yap u. Sher 1999).

Die Entwicklung einer IFN- γ -vermittelten Typ1-Antwort ist essentiell für die Kontrolle der intrazellulären Vermehrung von Toxoplasmen. Um jedoch einer Immunpathologie vorzubeugen, ist es notwendig, die Zytokinantwort zu regulieren. Antagonisten einer Typ1-Antwort sind die von T_H2-Lymphozyten sezernierten Zytokine IL-10 und IL-4. Die Notwendigkeit der Regulation konnte in Zytokin-defizienten Mäusen gezeigt werden. IL-10-defiziente Mäuse sterben während der akuten Phase einer Infektion mit avirulenten Toxoplasmen an den Folgen einer Zytokin-vermittelten Immunpathologie (Gazzinelli *et al.* 1996). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass eine Infektion von Mäusen mit virulenten Toxoplasmen zu einer letalen Überproduktion von Typ1-Zytokinen führt. In den Tieren waren massive Nekrosen von Leber und Milz nachweisbar, die nicht auf eine Infektion der Zellen zurückzuführen waren. Eine Infektion mit gleichen Infektionsdosen avirulenter Toxoplasmen führte zu einer vergleichsweise moderaten Zytokinproduktion und Immunpathologie, die nicht den Tod der Tiere zur Folge hatte (Mordue *et al.* 2001).

In der chronischen Phase der Infektion sind Typ1-Zytokine ebenfalls entscheidend an der Aufrechterhaltung der Immunantwort beteiligt. In chronisch infizierten Mäusen führte die Neutralisation von IL-12 und IFN- γ zur Reaktivierung der Zysten und zur Entwicklung einer letalen *Toxoplasma*-Enzephalitis (Übersicht in: Yap u. Sher 1999, Denkers 1999).

3.2 Humorale Abwehr

Die spezifische humorale Immunantwort wird durch die T_H2-Subpopulation der CD4-positiven Lymphozyten induziert. T_H2-Zellen sezernieren vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Sie regulieren einerseits zellvermittelte Immunreaktionen und induzieren andererseits die Bildung Erreger-spezifischer Antikörper. Während einer *Toxoplasma*-Infektion wird eine Vielzahl Parasiten-spezifischer Antikörper gebildet. Die Bedeutung der spezifischen Antikörper für Abwehr einer *Toxoplasma*-Infektion war lange umstritten. Die Vakzinierung B-Zell-defizienter Mäuse mit attenuierten Toxoplasmen hatte gezeigt, dass Antikörper wesentlich zur Resistenz gegenüber einer Infektion mit virulenten Toxoplasmen beitragen. Die Antikörper binden an die Parasitenoberfläche und erschweren dadurch das Eindringen der Toxoplasmen in die Wirtszelle sowie deren Ausbreitung im Gewebe. Die Opsonierung zwecks Fc-Rezeptor-vermittelter Lyse und die Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung spielen bei der Abwehr einer *Toxoplasma*-Infektion eine eher untergeordnete Rolle (Sayles *et al.* 2000).

3.3 Antigene von *Toxoplasma gondii*

Im Verlauf einer *Toxoplasma*-Infektion wird eine Antigen-spezifische Immunantwort induziert. Bisher konnten eine Vielzahl B-Zell-stimulatorischer, jedoch nur wenige T-Zell-stimulatorische Antigene identifiziert werden.

Oberflächenantigene sind dem Immunsystem direkt zugänglich und somit ideale Ziele der Immunabwehr gegen extrazelluläre Parasiten. Mit einem Anteil von 5 % des Gesamtprotein-gehaltes ist das 30 kDa Oberflächenprotein SAG1 das dominierende Protein des Tachyzoitenstadiums. SAG1 induziert eine starke T- und B-Zell-Antwort. Ein aus immunisierten Mäusen etablierter SAG1-spezifischer CD8-positiver T-Zell-Klon zeigte *in vitro* zytolytische Aktivität gegenüber infizierten Wirtszellen und vermittelte schützende Immunität nach adoptivem Transfer in naive Mäuse (Übersicht in: Fischer *et al.* 1996). Zudem schützte die Immunisierung mit rekombinantem SAG1 oder mit für SAG1 codierender DNA Mäuse vor einer letalen Infektion mit virulenten Toxoplasmen (Petersen *et al.* 1998, Nielsen *et al.* 1999). Neben SAG1 wurden vier weitere Oberflächenproteine (SAG2, SAG3, SAG4 und SAG5) als natürliche Antigene identifiziert (Übersicht in: Boothroyd *et al.* 1998).

Proteine aus den Mikronemen und Rhoptrien werden nur über einen sehr begrenzten Zeitraum während der Wirtszellinvasion sezerniert und sind daher nur kurzzeitig für das Immunsystem zugänglich. Bisher wurden zehn Mikronemenproteine und neun Rhoptrienproteine identifiziert. Durch adoptiven Transfer Dendritischer Milzzellen, die zuvor mit *Toxoplasma*-Lysat inkubiert worden waren, konnte in Mäusen eine protektive Immunantwort ausgelöst werden. In diesen Tieren konnten neben Antikörpern gegen die Oberflächenproteine SAG1 und SAG2 hohe Antikörpertiter gegen die Mikronemenproteine MIC1 und MIC2 sowie gegen die Rhoptrienproteine ROP2, ROP3 und ROP4 nachgewiesen werden (Bourguin *et al.* 1998). Erst kürzlich wurde mit Hilfe eines murinen T-Zellklons das neue Rhoptrienprotein ROP9 identifiziert (Reichmann *et al.* 2002).

Eine weitere wichtige Gruppe von Zielantigenen der Immunantwort sind die sogenannten exkretorisch/sekretorischen Antigene (ESA). Sie repräsentieren etwa 90 % der zirkulierenden Antigene, die bereits am ersten Tag der Infektion im Serum des Wirtes nachweisbar sind. *In vitro* werden ESA von wirtszellfrei inkubierten Tachyzoiten in das Medium abgegeben. ESA sind hochimmunogen und induzieren sowohl humorale, als auch zelluläre Abwehrmechanismen. Durch einen Transfer von Serum oder T-Zellen von Ratten, die mit sekretorischen Antigenen immunisiert wurden, konnten Nackratten, die selbst keine T-Zellen besitzen, partiell vor einer letalen Infektion mit virulenten Toxoplasmen geschützt werden (Darcy *et al.* 1988). *Dense granule* Proteine sind der Hauptbestandteil der ESA. Bisher wurden 11 *dense granule* Proteine von *Toxoplasma* identifiziert. Neben GRA1-8 und zwei Isoformen einer NTPase wurde ein Protein mit der Aktivität einer Sauren Phosphatase nachgewiesen, das in den *dense granules* und auch in den Rhoptrien vorkommt (Metsis *et al.* 1995).

Dense granule Proteine werden *in vivo* während der gesamten intrazellulären Entwicklung in geringen Mengen abgegeben (Dubremetz *et al.* 1998). Nach der Sekretion sind sie in Abhängigkeit von ihren molekularen Eigenschaften als lösliche Antigene innerhalb der PV oder auch membranassoziiert bzw. membrangebunden im Bereich des tubulovesikulären Netzwerks, der PVM oder der Zystenwand lokalisiert. Durch DNA-Vakzinierung gegen GRA1, GRA7 und ROP2 konnte in resistenten Mäusen eine Typ1-Immunantwort induziert werden, die 70 %, 50 % bzw. 90 % der Tiere vor einer letalen Infektion schützte (Vercammen *et al.* 2000). Neben den B-Zell-stimulatorischen Eigenschaften aller *dense granule* Proteine konnte bisher nur für GRA1, GRA2 und GRA4 eine T-Zell-stimulatorische Potenz nachgewiesen werden (Übersicht in: Fischer *et al.* 1996).

4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Sekretorische Antigene sind starke Immunogene, für die in Tierexperimenten die Induktion einer schützenden Immunantwort nachgewiesen wurde (Duquesne *et al.* 1990). Bei der Suche nach neuen sekretorischen Antigenen von *Toxoplasma gondii* wurde in unserer Arbeitsgruppe das Protein p29 identifiziert und als sekretorisches Antigen charakterisiert (Stachelhaus 1996). Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Herstellung p29-spezifischer monoklonaler Antikörper mit dem Ziel der Charakterisierung der biologischen und immunologischen Eigenschaften des neuen Antigens. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper ist es möglich, ein Protein innerhalb einer Zelle zu lokalisieren. Die Kenntnis der Lage spezifischer Antikörperbindungsstellen ermöglicht Untersuchungen zur Identifikation immunogener Proteinbereiche, zur Membrantopologie oder zu Transport, Modifikation und Funktion eines Proteins.

Durch immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen wurde p29 als neues *dense granule* Protein (GRA7) identifiziert (Fischer *et al.* 1998). In dieser Proteinfamilie nimmt GRA7 eine Sonderstellung ein, da es als bislang einziges *dense granule* Protein von allen infektiösen Formen exprimiert wird (Ferguson 1999^a). Screening-Untersuchungen humaner Seren haben gezeigt, dass GRA7-spezifische Antikörper in der chronischen Phase weniger häufig nachweisbar sind als in der akuten Phase der Infektion (Jacobs *et al.* 1999). Diese Erkenntnisse wurden zum Anlaß genommen, die GRA7-spezifische Immunantwort im Gehirn chronisch infizierter Mäuse zu untersuchen. Da Toxoplasmen während der chronischen Phase der Infektion hauptsächlich im Gehirn des Zwischenwirtes persistieren, ist dieses Organ möglicherweise ein Ort GRA7-spezifischer Immunreaktionen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die Frage zu klären: Ist GRA7 ein Zielantigen der intrazerebralen Immunantwort?

Im Verlauf der Arbeit wurden virulente Toxoplasmen über einen langen Zeitraum ausschließlich in Zellkulturen passagiert. Vergleichende Analysen des GRA7-Gehaltes von *Toxoplasma*-Lysaten, die in großen Zeitabständen präpariert wurden, zeigten einen verminderten GRA7-Gehalt der frischeren Präparationen. Berichte über die Effekte der Langzeitkultivierung von *Theileria annulata*, einem *Toxoplasma* verwandten tierpathogenen Protozoon, beschrieben einen Verlust an Virulenz und eine verminderte Expression parasiteninduzierter Enzyme (Somerville 1998, Hall 1999). Dies war Anlaß, die Effekte einer dauerhaften Kultivierung virulenter Toxoplasmen zu untersuchen. Dazu wurden Toxoplasmen aus der Langzeitkultur und *in vivo* passagierete Toxoplasmen bezüglich der Virulenz, des Zellkulturverhaltens, des Proteinmusters und des Antigengehaltes verglichen. Wenn auch die Attenuierung von Toxoplasmen mit einer reduzierten Expression bestimmter Proteine einher geht, ist es möglich, Virulenz-assoziierte Proteine durch Vergleich mit dem Wildtyp zu identifizieren. Die Kenntnis Virulenz-assoziiierter Proteine, ihrer Funktionen und ihrer Rolle in der Wirt-Parasit-Wechselbeziehungen ist von Bedeutung für ein Verständnis der Pathomechanismen einer *Toxoplasma*-Infektion. Virulenz-assoziierte immundominante Antigene der Parasiten sind ideale Kandidaten für die Entwicklung wirkungsvoller Vakzine. Ist GRA7 ein solches, mit der Virulenz von *T. gondii* korrelierendes Protein?

II. Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

Sterile Werkbank	Gelaire HF BSB 4A (Flow Lab, Meckenheim, D)
CO ₂ -begaster Brutschrank	Heraeus B 5060 EK/CO ₂ (Heraeus, Hanau, D)
Mikroskope	Zeiss IM35 (Carl Zeiss, Jena, D) Zeiss Photomikroskop III (Carl Zeiss) Nikon SMZ-1 (Nikon, München, D)
Kühlzentrifugen	J-6B (Beckmann, München, D) Rotanta 96 RC (Hettich, Tuttlingen)
Tischzentrifuge	15415 C (Eppendorf, Hamburg, D)
Ultrazentrifuge	Optima L-60 (Beckmann)
ELISA-Photometer	SLT Spectra (SLT Labinstruments, Crailsheim, D)
Digitalwaage	Precisa 600C (Oehmen Labortechnik, Essen, D)
Feinwaage	JL-180 (Chyo Balance Corporation, Kyoto, J)
pH-Meter	761 Calimatic (Knick, Berlin, D)
Magnetrührer	IKAmag RCT (Janke & Kunkel, Staufen, D)
Tischrüttler	Vortex VF2 IKA (Janke & Kunkel)
Wasserbad	Typ 3041 (Köttermann, Häningsen, D)
Heizblock	TCS Metallblock-Thermostat (Barkey, Bielefeld, D)
Elektroelutionssystem	Biotrap (Schleicher & Schüll, Dassel, D)
Western Blot-Kammer	CarboGlas (Schleicher & Schüll)
Netzgeräte	PS 3002, PS ST 504 (Gibco BRL, Eggenstein, D) PS LKB GPS 200/400 (LKB Wallac, Turku, SF) EPS 3500 XL (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, S)
Vakuumpumpe	Duo 008 B (Pfeiffer, München, D)
FrenchPress	FrenchPress Minicell (SLM Aminco, Cambridge, GB)
Bestrahlungsgerät	Gammacell 1000 Elite (MDS Nordion, Ontario, CDN)
Dampfdrucksterilisator	Autoklav P23 (Melag, Düsseldorf, D)
Beta-Counter	1205 Betaplate (LKB Wallac)
Zellernte-Gerät	Basic 96 Harvester (Zinser Analytic Skatron, Frankfurt, D)
Speed vac	Unicyro MC 2L -80°C (Oehmen Labortechnik)

1.2 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden, falls nicht anders angegeben, steril bezogen.

Bakteriologische Petrischalen (Greiner, Nürtingen, D)

Ø 6 cm, zur Präparation von Milz- und Gehirnzellen.

Zellschaber (Greiner)

Zellkulturflaschen (Costar Tecnomara, Fernwald, D)

25 cm², 75 cm² mit und ohne belüfteten Deckel, zur Kultivierung von Fibroblasten, Toxoplasmen, Gehirnzellen und B-Zell-Hybridomen.

Zellkulturplatten

24- und 48-well Platten (Costar), zur Expansion von B-Zell-Hybridomen und Adhärenz von Peritonealmakrophagen.

Mikrotiterplatten

96-well Zellkulturplatten (Greiner) und 96-well A/2-Zellkulturplatten (Costar), für T-Zell-Proliferationstests und zur Klonierung von B-Zell-Hybridomen.

96-well Immunoplate MaxiSorp F96, unsteril (Nunc, Wiesbaden, D) für ELISA.

Chamber Slides

4 x 8.9 x 20 mm, zur Kultivierung von Fibroblasten (Nunc)

Zentrifugenröhrchen

15 ml Spitzboden (Sarstedt, Nümbrecht, D), 50 ml Spitzboden (Greiner)

Cryotubes

1.8 ml (Nunc), zur Kryokonservierung von Zellen.

Eppendorf-Caps, unsteril

0.75 ml, 1.5 ml, 2.0 ml, (Eppendorf)

Einmalspritzen

1 ml (Ersta, Asik, DK), 5 ml, 10 ml, 20 ml (Luer Amefa, Kriftel, D)

Plastikpipetten (Greiner)

Kanülen

0.4 x 12 mm (Sherwood Medical, Schwalbach, D),

0.9 x 40 mm, 1.2 x 40 mm (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

Einmalspitzen

10 µl (Eppendorf), 200 µl (Polylab, Seoul, Korea) und 1000 µl (Greiner)

Sterilfilter 0.2 µm (Millipore, Molsheim, F)

1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), Amersham Pharmacia und Sigma (Deisenhofen, D) in p.A.-Qualität bezogen. Kulturmedien und Zusätze wurden, falls nicht anders angegeben von den Firmen Gibco (Eggenstein, D), Boehringer Mannheim und Amersham Pharmacia bezogen. Das Wasser zur Herstellung von Lösungen wurde mit einer Anlage der Firma Millipore entmineralisiert.

1.4 Lösungen für die Zellkultur

Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM): Das IMDM-Trockenpulver mit Phenolrot wurde in deionisiertem Wasser gelöst, mit 3.024 g/l NaHCO₃ und 50 µM β-Mercaptoethanol versetzt, über Membranfilter sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Dieses Basismedium wurde mit 2 mM L-Glutamin, 5-15 % inaktiviertem (56°C, 30 min) fetalem Kälberserum (FCS) und 1 mM Natriumpyruvat supplementiert. Den Medien zur Kultivierung von B-Zell-

Hybridomen und Gehirnzellen wurde zusätzlich 50 IE/ml Penicillin/Streptomycin zugegeben. Bei der Kultivierung von Toxoplasmen und Wirtszellen wurde zur schnelleren Aufdeckung bakterieller Kontaminationen auf den Zusatz von Antibiotika verzichtet.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM): Das Basismedium ohne Phenolrot wurde mit 2 mM L-Glutamin und 10 % FCS supplementiert und für die Kultur von Gehirnzellen verwendet.

Phosphate-buffered saline (PBS): Für die Anwendung in der Zellkultur wurde steriler PBS-Puffer (pH 7.3) von Serag Wiessner, Naila, D, bezogen.

Zehnfach konzentrierter PBS-Puffer (1.37 M NaCl, 26 mM KCl, 76 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄ in *Aqua bidest.*, pH 6.6) wurde sterilfiltriert und bei der Präparation von Gehirnzellen verwendet.

Polyethylenglycol 1500 (50 %) wurde zur Fusionierung von Myelomzellen mit Milzzellen verwendet.

Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (HAT): Zur Selektion von B-Zell-Hybridomen wurde dem Kulturmedium (IMDM, 15 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 % Penicillin/Streptomycin) HAT in einer Endkonzentration von 0.1 mM Hypoxanthin/0.4 µM Aminopterin/16 µM Thymidin zugesetzt. Nach Beendigung der Selektionsphase wurden die B-Zell-Hybridome zur Adaption an veränderte Kulturbedingungen in Selektionsmedium ohne Aminopterin (HT-IMDM) kultiviert.

Interleukin-2 (IL-2) ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor. Es wurde dem Medium zur Kultivierung CD4-positiver Gehirnzellen in einer Endkonzentration von 0.05 % zugesetzt. Als IL-2-Quelle diente der Kulturüberstand des transfizierten Myeloms **P3X63-Ag8.653** (Karasuyama u. Melchers, 1988).

Interleukin-6 (IL-6) wurde bei der Kultivierung von B-Zell-Hybridomen in einer Endkonzentration von 0.1 % (etwa 30 U IL-6/ml) eingesetzt. Als IL-6-Quelle diente ein Kulturüberstand von **D10.G4.1** T-Zellen (Kaye *et al.* 1984), die 24 h mit Concanavalin A stimuliert wurden.

Concanavalin A (Con A, 2 µg/ml) ist ein pflanzliches Lektin, das als Mitogen polyklonal T-Zellen aktiviert. Der Zytokingehalt der Stimulationsüberstände wurde über die zytokinabhängige Proliferation IL-6-sensitiver Indikatorzellen ermittelt. Dazu wurden Indikatorzellen in einem Proliferationstest (vgl. II.11.2.1) mit seriell in Kulturmedium (IMDM, 2 mM Glutamin, 5 % FCS) verdünnten Stimulationsüberständen inkubiert. Ein entsprechend verdünnter Standard diente als Positivkontrolle. Die Zytokinaktivitäten wurden in *units* (U) berechnet. Ein U entspricht der Zytokinkonzentration, die eine halbmaximale Stimulation der Indikatorzellen bewirkt.

1.5 Antikörper

Antiseren und monoklonale Antikörper (mAk) wurden zum Nachweis von *T. gondii*-Antigenen in Western Blot-Analysen und *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eingesetzt (Tab. 1). Die für diese Anwendungen geeigneten Antikörperverdünnungen waren zuvor mittels ELISA (vgl. II.9.1.2) bestimmt worden.

Tab. 1: *Toxoplasma gondii*-spezifische Antikörper

Antigen	Klon/Serum	Spezies/Ak-Klasse	Präp.*	Referenz
SAG1	GII-9	Maus, IgG1	I	Gonzales, 1988
ROP1	92-211/051	Maus, IgG	A	Behringwerke, n.v.
ROP2,3,4	T3 4A7	Maus	A	Sadak <i>et al.</i> 1988
ROP2,3	T5 2D1	Maus	A	Lerliche u. Dubremetz, 1991
MIC3	T4 2F3	Maus	I	Achbarou <i>et al.</i> 1991 ^b
GRA1	T5 2B4	Maus, IgG2a	A	Achbarou <i>et al.</i> 1991 ^a
GRA2	T4 1F5	Maus	A	Achbarou <i>et al.</i> 1991 ^a
GRA3	T6 2H11	Maus	A	Achbarou <i>et al.</i> 1991 ^a
GRA4	Tx34.31	Maus, IgG2a	K	Meisel <i>et al.</i> 1995
GRA7	TxE2	Maus, IgM**	I	Fischer <i>et al.</i> 1998
GRA7	BATO214	Maus, IgG2a**	A	Jacobs <i>et al.</i> 1998
GRA7	5-241-178	Maus, IgG2a**	I	Bonhomme <i>et al.</i> , 1998
NTPase-I/II	Serum	Kaninchen, IgG	I	Asai <i>et al.</i> 1995
SP	S16	Maus, IgG ₃	K	Metsis <i>et al.</i> 1995

*A = Aszites, I = gereinigtes Immunglobulin, K = Hybridomkulturüberstand

** Isotypisierung im Rahmen dieser Arbeit, n.v. nicht veröffentlicht

Der Antikörper GII-9 und ein Kaninchen-anti-*T. gondii*-Serum wurden von BioGenex (San Ramon, USA) bezogen. Den Antikörper 92-211/051 erhielten wir durch Kooperation mit der Firma Behring (Marburg, D). Die GRA7-spezifischen Antikörper BATO214 und 5-241-178 wurden uns von D. Jakobs (Innogenetics, Ghent, B) bzw. von R. Ziemann (Abbott, Illinois, USA) zur Verfügung gestellt. Die Hybridome Tx34.31 und TxE2 wurden in unserer Arbeitsgruppe von R. Meisel etabliert und charakterisiert (Meisel *et al.* 1996).

Von T. Asai (Institut for Tropical Medicine an der Keio-Universität, Tokyo, J) erhielten wir das anti-NTPase-Serum, von E. Petersen (Institut for Serology, Kopenhagen, DK) den Antikörper S16. Ein Antiserum gegen rekombinant hergestelltes *T. gondii*-Antigen H4 überließ uns A. Johnson (Institut for Molecular Parasitology an der University of Technology, Sydney, AUS). Alle weiteren in Tabelle 1 aufgeführten Antikörper stellte uns J.F. Dubremetz (Institut de Biologie am Institut Pasteur, Lille, F) zur Verfügung.

Als Sekundäntikörper in ELISA und Western Blot-Analysen wurden an Peroxidase gekoppelte Ziege-anti-Maus-IgG/IgM-Antikörper (Dianova, Hamburg, D) und Ziege-anti-Kaninchen-IgG/IgM-Antikörper F(ab')₂-Fragmente (SBA, Birmingham, GB) eingesetzt.

1.6 Software

Die Graphischen Darstellungen und die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden mit „Prism 2.01“ (GraphPad Software, San Diego, USA) oder MS Excel (Microsoft, Redmond, USA) erstellt. Die densitometrische Analyse des Proteingehaltes und die Berechnung der apparenten Molekulargewichte von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mit „GelPro Analyzer 2.0“ (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

2 Zelllinien und ihre Kultivierung

Alle Zellen wurden bei 37°C in einem Brutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO₂ kultiviert. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank

unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Bei der Zellernte bzw. Zellpräparation wurden die Zellen, falls nicht anders angegeben, durch Zugabe von frischem Kulturmedium und anschließender Zentrifugation (10 min, 200 g, 4°C) gewaschen. Langzeitkulturen wurden regelmäßig nach dem Verfahren von Schmitt *et al.* 1988 auf Kontamination durch Mykoplasmen getestet.

2.1 Fibroblasten

Die für diese Arbeit verwendeten Fibroblasten wurden von ATCC (Manassas, USA) bezogen und in IMDM mit 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 5 % FCS kultiviert. Die Zellen wurden in einer Dichte von $4-6 \times 10^4$ /ml in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² oder 75 cm² ausgesät und nach Ausbildung eines dichten Zellrasens geerntet.

L929: Die aus murinem Subkutangewebe isolierte schnell wachsende Fibroblastenlinie L929 (Sanford *et al.* 1948) diente als Wirtszelle für *T. gondii*-Tachyzoiten. Die Zellen wurden nach 2–3 Tagen Kultivierung bei einer Zelldichte von etwa 10^6 Zellen/ml bzw. 2×10^5 Zellen/cm² mit Hilfe eines Zellschabers geerntet.

HS27: Die aus menschlicher Haut isolierte langsam wachsende Fibroblastenlinie HS27 (Suss-Toby *et al.* 1996) wurde als Wirtszelle für Bradyzoiten und Tachyzoiten verwendet. Diese stark adhärenen Zellen wurden in Intervallen von 1-2 Wochen bei einer Zelldichte von etwa $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml durch Inkubation mit 0.05 % Trypsin und 0.02 % EDTA (Biochrom, Berlin, D) in PBS (15 min, 37°C) geerntet.

2.2 Plasmazytom

X63-Ag8.653: Die murine Plasmazytomlinie X63-Ag8.653 (De St. Groth u. Scheidegger 1980) wurde ebenfalls von ATCC bezogen und in IMDM mit 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 10 % FCS kultiviert. Durch Fusion dieser Zellen mit *T. gondii*-spezifischen B-Zellen immunisierter Mäuse wurden Hybridome (vgl. II.8.2) zur Produktion monoklonaler Antikörper hergestellt.

2.3 B-Zell-Hybridome

TxE2 und Tx34.31: Aus den Kulturüberständen der in unserer Arbeitsgruppe etablierten B-Zell-Hybridome TxE2 und Tx34.31 wurden durch Ammoniumsulfat-Fällung und nachfolgende Entsalzung (vgl. II.8.6) Antikörperkonzentrate hergestellt.

2.4 Kryokonservierung

B-Zell-Hybridome und Klone wurden frühzeitig während der Expansionsphase unter Verwendung eisgekühlter Medien und Behälter kryokonserviert. Dazu wurden die geernteten Zellen nach einem Waschschrift in frischem Medium gezählt, zentrifugiert (10 min, 200 g, 4°C) und das Sediment in eiskaltem Einfriermedium (FCS, 10 % Dimethylsulfoxid, Serva, Heidelberg, D) in einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Die Zellsuspension wurde unverzüglich in *Cryotubes* überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter für 24 h bei -70°C kryokonserviert. Anschließend wurden die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurden gefrorene Zellen zügig, bis auf einen kleinen Eisrest, bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Unter sanftem Rühren wurden

tropfenweise zunächst 3 ml kaltes FCS, dann 20 ml Medium zugegeben. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 200 g, 4°C), in Medium gewaschen und in 24-well Zellkulturplatten ausgesät.

3 Zellpräparationen

3.1 Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme NMRI, BALB/c und C57BL/10 wurden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf unter SPF-Bedingungen gezüchtet. Kurz vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch Genickbruch oder in CO₂-gesättigter Atmosphäre getötet. Für die Präparation von Milzzellen, Peritonealmakrophagen, adulten Gehirnzellen und Liquor, sowie zur Passage von Toxoplasmen wurden Mäuse im Alter von 3-6 Monaten verwendet. Zur Gewinnung neonataler Gehirnzellen wurden neugeborene Mäuse mit einem Alter von maximal zwei Tagen präpariert.

3.2 Milzzellen

Milzzellen nicht infizierter Mäuse wurden als antigenpräsentierende Zellen (APC) in T-Zell-Proliferationstests verwendet. Als Quelle *T. gondii*-spezifischer B-Zellen für die Herstellung von Hybridomzellen dienten die Milzzellen immunisierter Mäuse.

Zur Gewinnung von Milzzellen wurden bei einer getöteten Maus Bauchwand und Peritoneum seitlich eröffnet und die Milz steril entnommen. Durch Zerreiben des Organs zwischen den matt geschliffenen Flächen zweier steriler Objektträger wurde eine Zellsuspension in eiskaltem Medium (IMDM, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 5 % FCS) hergestellt. Nach der Sedimentation von Bindegewebsresten und Zellaggregaten durch Inkubation in einem Spitzbodenröhrchen (10 min auf Eis) wurden die im Überstand enthaltenen Zellen zentrifugiert (10 min, 200 g, 4°C). Das Sediment wurde in 2 ml eiskalter 0.83 %iger NH₄Cl-Lösung aufgenommen und zur Lyse der Erythrozyten 3 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Die verbliebenen Leukozyten wurden zweifach in eiskaltem Medium gewaschen, erneut in Medium aufgenommen und bis zum Testansatz auf Eis gestellt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug etwa 10⁸ Milzzellen/Maus. Vor der Verwendung als APC wurden die Milzzellen mit einer Dosis von 10 Gy in einem Bestrahlungsgerät mit ¹³⁷Cs-Quelle bestrahlt und somit die Proliferation der Zellen unterdrückt.

3.3 Peritonealexsudat-Makrophagen

Peritonealexsudat-Makrophagen wurden als *feeder cells* bei der Klonierung von B-Zell-Hybridomen verwendet. Durch Sekretion von Zytokinen stimulieren sie die Proliferation und Immunglobulin-Sekretion der B-Zellen in den Klonierungskulturen. Zudem phagozytieren sie den durch absterbende Zellen entstehenden Debris.

Durch intraperitoneale Injektion von 1 ml 1 %igem Thioglycollat-Medium (Difco, Detroit, USA) wurde die Einwanderung inflammatorischer Makrophagen in die Bauchhöhle von Mäusen induziert. Vier Tage später wurden die Tiere getötet und die Bauchwand unter Schonung des Peritoneums eröffnet. Anschließend wurde die Bauchhöhle mehrfach mit 10 ml eiskaltem Medium (IMDM, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat, 5 % FCS) gespült und die so gewonnene Zellsuspension in einer Petrischale für 2 h bei 37°C inkubiert. Nicht adhärenente Zellen wurden mit dem Überstand abgesaugt, adhärenente Zellen wurden mit

eiskaltem Medium abgespült und zweifach gewaschen. Nach Beller *et al.* 1980 enthält die Population der adhärenen Zelle über 95 % Makrophagen. Die durchschnittliche Zellausbeute lag bei etwa 5×10^6 Zellen/Maus.

3.4 Gehirnzell-Primärkulturen

Gehirnzell-Primärkulturen neonataler Mäuse wurden für die Passage zystenbildender *Toxoplasma*-Stämme verwendet. Die Kulturen liefern einen über Wochen stabilen Monolayer aus Gliazellen. Sie eignen sich als Wirtszellen für die Kultivierung sich langsam vermehrender Toxoplasmen. Spätestens zwei Tage nach der Geburt wurden neugeborene Mäuse in CO₂-gesättigter Atmosphäre getötet und dekapitiert. Nach Ablösung der Kopfhaut und Entfernung der Schädelkalotte wurde das Gehirn entnommen. Anschließend wurde der Kortex der Großhirnhemisphären abgelöst, unter dem Auflichtmikroskop (30fache Vergrößerung) von den Hirnhäuten befreit und in eiskaltem Medium (DMEM, 2 mM Glutamin, 10 % FCS) mit Hilfe einer Schere zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde zweifach durch Zugabe von eiskaltem Medium und anschließender Sedimentation (10 min auf Eis) gewaschen. Das Sediment wurde in 1 ml Medium mit 0.3 U/ml Kollagenase D (Boehringer Mannheim) aufgenommen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde jeder Ansatz mit 0.2 mg/ml DNase I (Boehringer Mannheim) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Enzymbehandlung lag eine Einzelzellsuspension vor. Die Zellen wurden zweifach mit kaltem Medium gewaschen und mit einer Zelldichte von $2-4 \times 10^5$ Zellen/cm² in Zellkulturplatten oder 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Das Medium wurde jeden dritten Tag erneuert, dabei wurden nicht adhärenente Zellen entfernt. Nach etwa zwei Wochen war ein für die Passage von Toxoplasmen geeigneter Zellrasen entstanden.

Für die Analyse der *T. gondii*-spezifischen zellulären Immunantwort im Gehirn wurden Gehirnzellen adulter Mäuse präpariert. Zu Beginn wurde das Gefäßsystem der Mäuse perfundiert, um eine Kontamination der Präparation mit Leukozyten aus dem Blut zu vermeiden. Die Maus wurde durch Inhalation von Methoxyfluran (Metofane, Janssen-Cilag, Neuss, D) narkotisiert. Während sich das Tier in tiefer Narkose befand, wurde der Thorax eröffnet und der rechte Ventrikel inzidiert. Durch langsame linksventrikuläre Injektion von 40 ml eiskaltem PBS wurde das gesamte Gefäßsystem bis zur völligen Blutleere der Organe perfundiert. Die Perfusionsflüssigkeit wurde dabei über die Inzision des rechten Ventrikels drainiert. Während dieser Prozedur trat der Tod der Maus ein. Der Kortex der Großhirnhemisphären wurde entnommen, zerkleinert und nach Zugabe von 2.5 ml Medium (DMEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin) bis zur Entstehung einer homogenen Suspension mehrfach durch eine Kanüle (1.2 x 40 mm bzw. 18 gauge) resuspendiert. Anschließend wurden 0.3 U Kollagenase D zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde der Ansatz mit 0.2 mg/ml DNase I versetzt und wiederum für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach der Enzymbehandlung wurde die Zellsuspension mit 40 ml kaltem Medium gewaschen, das Sediment in 5 ml Medium aufgenommen, durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von 70 µm (Falcon, Becton Dickinson) gepresst und erneut gewaschen. Aus dieser Gesamthirnzellpräparation wurde die Population der CD4-positiven Zellen isoliert (vgl. II.11.1).

4 Toxoplasmen

4.1 Kultivierung und *in vivo*-Passage

Die für diese Arbeit verwendeten *T. gondii*-Isolate wurden uns von M. Saathof (Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn, D) zur Verfügung gestellt.

Das *T. gondii*-Isolat BK wurde ursprünglich aus dem Liquor eines an Toxoplasmose erkrankten Kindes isoliert (Winser *et al.* 1948). In Mäusen verläuft eine Infektion mit diesen hochvirulenten Toxoplasmen (speziesinterne Gruppe I) letal. Dieses Isolat, das in Zellkulturen ausschließlich das Tachyzoitenstadium bildet, wurde in L929-Fibroblasten (vgl. II.2.1) kultiviert. Bei einem Parasit/Wirtszell-Verhältnis von 10:1 waren alle Wirtszellen 2-3 Tage nach Infektion lysiert. Extrazelluläre Toxoplasmen wurden durch Zentrifugation (5 min, 50 g, RT) weitgehend von Wirtszellen und Debris befreit und in einem zweiten Zentrifugationsschritt (15 min, 600 g, RT) aus dem Überstand sedimentiert.

Um einer Attenuierung der Parasiten vorzubeugen, wurde das Isolat BK parallel *in vivo* passagiert. Dazu wurden einer Maus 10^7 Tachyzoiten in 500 µl PBS intraperitoneal injiziert. Zwei Tage später wurde die Maus getötet und die Bauchwand unter Schonung des Peritoneums eröffnet. Die Bauchhöhle wurde zweifach mit 7 ml PBS (37°C) gespült und die in der Spülflüssigkeit enthaltenen Parasiten in PBS gewaschen (15 min, 600 g, RT). Für die Präparation von *Toxoplasma*-Lysaten wurden die *in vivo* passagierten Toxoplasmen einmalig in der Zellkultur expandiert.

Das *T. gondii*-Isolat DX wurde ursprünglich aus einem an Toxoplasmose erkrankten Schwein isoliert (Schlüter *et al.* 1991). Eine Infektion mit diesen schwach virulenten Toxoplasmen (Gruppe II) führt bei Mäusen zu einer chronischen Toxoplasmose mit Bildung von Gewebezysten. Für die Passage dieser auch *in vitro* zystenbildenden Toxoplasmen wurden Kulturen neonataler muriner Gehirnzellen (vgl. II.3.4) oder HS27-Fibroblasten (vgl. II.2.1) verwendet. Diese langsam wachsenden Wirtszellen bilden einen Rasen aus adhärennten Zellen, der über Wochen stabil bleibt, ohne die sich langsam vermehrenden Toxoplasmen zu überwachsen. Konfluente Wirtszellkulturen wurden mit 0.1-1 Bradyzoiten/Zelle infiziert. Innerhalb der folgenden 2-3 Wochen entwickelten sich intrazelluläre Zysten. Zystenhaltige Kulturen wurden nach vorsichtigem Resuspendieren geerntet und zentrifugiert (5 min, 50 g, RT). Das Sediment wurde in 200 µl PBS aufgenommen und mit 0.05 % Trypsin und 0.02 % EDTA bei RT, unter mikroskopischer Kontrolle, für 10-20 min inkubiert. Nach vollständiger Lyse der Zysten wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 300 µl FCS gestoppt und die Toxoplasmen in Kulturmedium gewaschen. Durchschnittlich wurden pro Zyste zwischen 500-1000 Bradyzoiten gewonnen.

Für die Passage *in vivo* wurden adulte Mäuse mit 3-5 Zysten in 100 µl PBS i.p. infiziert. Nach etwa vier Wochen wurden die Gehirne der Tiere entnommen, von Hirnhäuten befreit, zerkleinert und durch Inkubation mit 0.3 U/ml Kollagenase D (1 h, 37°C) mazeriert. Anschließend wurde die Gewebesuspension in 15 ml Medium (DMEM, 2 mM Glutamin, 10 % FCS) aufgenommen, mit 10 ml Ficoll-Paque unterschichtet und zentrifugiert (30 min, 800 g, 4°C, ungebremst). Die im Sediment angereicherten Zysten wurden, nach Lyse der Erythrozyten, in 0.83 %iger NH_4Cl (2 ml, 3 min, RT), gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Aus einer Maus wurden etwa vier Wochen nach Infektion durchschnittlich 1000 Zysten gewonnen. Für die Verwendung als Antigen wurden die Zysten lysiert und die darin enthaltenen Bradyzoiten zu Lysat-Antigen (vgl. II.5.2.1) verarbeitet.

4.2 Messung der Virulenz

Um den Effekt der *in vitro*-Passage auf die Virulenz von Toxoplasmen zu untersuchen, wurden Parasiten des Isolates BK über ein Jahr ausschließlich in Zellkulturen passagiert. Zur Kontrolle wurden BK-Toxoplasmen über den gleichen Zeitraum ausschließlich in Mäusen passagiert. Zum Vergleich der Virulenz wurden Gruppen von sechs 10-12 Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen mit $10 \cdot 10^5$ Tachyzoiten/Maus aus *in vitro* oder *in vivo*-Passage infiziert und der Zeitpunkt des Todes aufgezeichnet. Überlebende Mäuse wurden über einen Zeitraum von drei Monaten beobachtet. Die tatsächliche Infektion der überlebenden Tiere wurde durch den Nachweis *Toxoplasma*-spezifischer Antikörper mittels ELISA verifiziert.

4.3 Toxoplasmen-Proliferationstest

Die intrazelluläre Proliferation der Toxoplasmen wurde über den Einbau von ^3H -Uracil in die parasitären Nukleinsäuren gemessen. Toxoplasmen besitzen im Gegensatz zu Säugerzellen das Enzym Uracil-Phosphoribosyl-Transferase und sind somit in der Lage, externes Uracil für die Nucleotidsynthese zu nutzen. ^3H -Uracil wird in die RNA und DNA intrazellulärer Toxoplasmen eingebaut (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977).

Zur Quantifizierung der Proliferation wurden L929-Zellen in 96-well Zellkulturplatten kultiviert und mit 0.01-10 Toxoplasmen/Wirtszelle infiziert. Nach 1, 24 bzw. 48 h wurde jeweils ein Ansatz mit $1 \mu\text{Ci/well}$ (37kBq/well) ^3H -Uracil pulsmarkiert und nach weiteren 18 h bei -20°C eingefroren. Dabei werden die Zellmembranen zerstört und die Nukleinsäuren freigesetzt. Für die Messung des inkorporierten ^3H -Uracils wurden die Testkulturen aufgetaut und mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) übertragen. Die Filter wurden 20 min bei 100°C in einem Trockenschrank getrocknet und anschließend, nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac), einzeln in Plastikfolie eingeschweißt. Die Auswertung der Analysen erfolgte in einem Beta-Counter. Hierbei wird die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung gemessen und in *counts per minute* (cpm) berechnet. Die Summe der pro Ansatz errechneten cpm gilt als Maß für die Stärke der Proliferation der Toxoplasmen. Für jede Versuchsbedingung wurden sechs Parallelansätze angelegt, deren arithmetisches Mittel \pm SD als Ergebnis angegeben ist.

4.4 Mikroskopische Analyse der Infektion von Wirtszellen

Die Fibroblastenlinie HS27 eignet sich aufgrund ihres Wachstums als adhärenter Monolayer sehr gut als Wirtszelle für die mikroskopische Untersuchung intrazellulärer Toxoplasmen. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 10^5 Zellen/Kammer in Objektträgerkulturen (Lab-Tek Chamber Slides, $4 \times 8,9 \times 20$ mm, NUNC, Wiesbaden, D) ausgesät und einen Tag später mit 10 Toxoplasmen/Zelle infiziert. Um die Invasion und Vermehrung von Toxoplasmen in Wirtszellen zu verfolgen, wurden aus den Testkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten gefärbte Präparate angefertigt. Dazu wurden die Kulturen mit vorgewärmtem PBS (37°C) gespült, mit „Diff-Quick-Lösungen“ (Baxter Diagnostics, Düringen, CH) nach Herstellerprotokoll fixiert und gefärbt und anschließend mit Entellan (Merck) eingedeckt. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch bei 400facher bzw. 630facher Vergrößerung untersucht. In Dreifachbestimmungen wurde in jedem Präparat aus 200 Zellen die Anzahl der infizierten Zellen bestimmt. Zusätzlich wurde aus jeweils 100 infizierten Zellen die Anzahl der Parasiten/Einzelle ermittelt. Der Prozentsatz der infizierten Zellen und die Anzahl der Toxoplasmen/Einzelle wurden als Mittelwerte \pm SD angegeben.

5 Antigenpräparationen

5.1 Rekombinantes GRA7 und GRA7-Peptid

Rekombinantes GRA7 (rGRA7) wurde uns von D. Jacobs (Innogenetics, Ghent, B) zur Verfügung gestellt und in ELISA, Western Blot-Analysen, sowie zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. An Stelle der ersten vier Aminosäuren des nativen GRA7 enthält das rekombinante Protein N-terminal ein 25 Aminosäuren umfassendes Fragment des murinen TNF- α , gefolgt von sechs Histidylresten (Jacobs *et al.* 1998).

5.2 Herstellung von *Toxoplasma*-Lysaten

Toxoplasma-Lysate wurden, falls nicht anders angegeben, aus Tachyzoiten des Isolates BK hergestellt. Bei der Präparation von *Toxoplasma*-Lysat-Antigen (TLA) wurden die Parasiten durch Einfrier-/Auftauzyklen lysiert. Die Parasitenmembranen bleiben dabei weitgehend intakt, so dass TLA hauptsächlich lösliche *Toxoplasma*-Proteine enthält. Bei der Herstellung von *Toxoplasma*-FrenchPress-Lysat (TFL) werden die Membranen durch hohe Scherkräfte völlig zerstört. Daher enthält TFL neben löslichen auch membranständige Proteine.

5.2.1 Lysat-Antigen (TLA)

Frisch geerntete Toxoplasmen wurden zweifach in PBS gewaschen (15 min, 600 g, 4°C) und das Sediment, nach Schockfrostung in flüssigem Stickstoff (-196°C), bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Herstellung von *Toxoplasma*-Lysat Antigen (TLA) wurden die gefrorenen Toxoplasmen zügig aufgetaut, in einer Konzentration von 10⁹/ml in *Aqua dest.* aufgenommen und durch zehn Einfrier-/Auftau-Zyklen im Wechsel zwischen flüssigem Stickstoff und einem 37°C Wasserbad aufgeschlossen. Aus diesem Gesamtlisat wurden durch zweifaches Zentrifugieren (20 min 800 g und 15 min 10000 g, 4°C) mikroskopisch intakte Parasiten und *Toxoplasma*-Debris entfernt. Nach Bestimmung des Proteingehaltes (vgl. II.5.3) wurde der Überstand aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Durchschnittlich wurden aus 10⁹ Toxoplasmen 1-2 mg Protein gewonnen. Analog wurden Lysate des avirulenten *Toxoplasma*-Isolates DX hergestellt. Für das Screening von Hybridomkulturüberständen wurden L929-Zellen als Kontrollantigen entsprechend präpariert.

5.2.2 FrenchPress-Lysat (TFL)

Frisch geerntete Toxoplasmen wurden zweifach in PBS gewaschen (15 min, 600 g, 4°C) und in einer Konzentration von 1-2 x 10⁹ Toxoplasmen/ml in PBS resuspendiert. In einer „FrenchPress Minicell“ wurde die *Toxoplasma*-Suspension zweifach, bei einem Druck von 18000 psi (etwa 2565 bar), hohen Scherkräften ausgesetzt. Bei der mikroskopischen Kontrolle der Präparation waren keine Toxoplasmen mehr nachweisbar. Für die Verwendung in der Affinitätschromatographie (vgl. II.7.1) wurde TFL zusätzlich über 3 min in einem Glas-in-Glas-Homogenisator nachbehandelt. Debris wurde durch zweifaches Zentrifugieren (15 min, 10000 g und 1 h, 100000 g, 4°C) entfernt. Durchschnittlich wurden aus 10⁹ Toxoplasmen 1-2 mg Protein gewonnen.

5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt von *Toxoplasma*-Lysaten wurde mit dem „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce) bestimmt. Proteine bilden in alkalischer Lösung Komplexe mit Cu²⁺-Ionen (Biuret-

Reaktion). Die dabei durch Reduktion entstandenen Cu^+ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, dessen Farbintensität der Proteinkonzentration proportional ist. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei $0.5 \mu\text{g}$ Protein/ml. Für den Test wurden die Proben und der Standard seriell in PBS verdünnt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin in einer Verdünnungsreihe von 20-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Als Leerwerte dienten PBS und BCA-Lösung. In Dreifachansätzen wurden Standard und Proben 1:10 mit BCA-Lösung versetzt und in einer 96-well Mikrotiterplatte für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Die Extinktion der Ansätze wurde in einem ELISA-Photometer bei 562 nm gemessen. Bei der Auswertung wurden die Extinktionswerte der Standardverdünnungen gegen deren Proteinkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe der „Prism 2.01 Software“ wurde aus der resultierenden Regressionsgeraden die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

Die BCA-Methode wird in Anwesenheit von Natriumazid gestört. Aus diesem Grunde wurde der Proteingehalt Natriumazid-haltiger Antikörperlösungen durch Messung der Absorption bei 280 nm gegen PBS als Leerwert gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Bezug auf eine IgG-Standardlösung ($1 \text{ mg}/\text{ml} \cong 1$ Absorptionseinheit) berechnet.

6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Toxoplasma-Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, und die proteinhaltigen Gele wurden gefärbt, partiell elektroeluiert (vgl. II.7.2) oder zur Analyse der enthaltenen Antigene auf Nitrozellulose geblottet (vgl. II.9.2).

6.1 Eindimensionale SDS-PAGE

Die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit diskontinuierlichen Gelen (Laemmli 1970) durchgeführt. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die meisten Proteine mit einem konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis. Die stark negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode. Dabei werden sie durch den Molekularsieb-Effekt der porösen Polyacrylamid-Matrix entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

Um die Auftrennung im Molekulargewichtsbereich um 30 kDa zu spreizen, wurden Trenngel mit einem Acrylamidanteil von 12 % verwendet. In einer vertikalen Elektrophoresekammer mit einer Trennstrecke von 11 cm (BRL) wurden analytische Elektrophoresen mit einer Geldicke von 0.5 mm und präparative Elektrophoresen mit einer Geldicke von 1.5 mm durchgeführt.

Trenngel: 12 % Acrylamid, 0.32 % Bisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.1 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 0.1 % Ammoniumperoxodisulfat; entgast.

Sammelgel: 3 % Acrylamid, 0.08 % Bisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, 0.1 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 0.1 % Ammoniumperoxodisulfat; entgast.

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Nach 30-60 min war das Gel polymerisiert. Nach Entfernung des n-Butanols wurde auf das feste Trenngel ein Sammelgel gegossen, in dem die zu trennenden Proteine konzentriert werden, damit sie gleichmäßig in das Trenngel einwandern. Der Kammerpuffer enthielt 50 mM Tris, 0.4 M Glycin, 0.1 % SDS.

Die auf das Gel aufgetragene Proteinmenge lag bei analytischen Elektrophoresen bei 20-80 µg/Spur, bei präparativen Elektrophoresen bei durchschnittlich 1 mg/Gel. Die Proben wurden mit 0.2 Volumenanteilen des fünffach konzentrierten Probenpuffers (40 % Glycerin, 10 % SDS, 250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 % Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95°C bzw. 10 min bei 80°C erhitzt und umgehend auf das Gel aufgetragen. Für die Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen enthielt der Probenpuffer zusätzlich 5 % β-Mercaptoethanol. Die Elektrophorese wurde bei 100 V im Sammelgel und bei 250 V im Trenngel durchgeführt, bis die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Über Nacht wurden die Elektrophoresen bei 30-50 V durchgeführt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurden bei jeder SDS-PAGE ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Der „low molecular weight marker“ (Biorad, München, D) enthält Phosphorylase b (97.4 kDa), bovines Serumalbumin (66.2 kDa), Ovalbumin (45.0 kDa), Carboanhydrase (31.0 kDa), Trypsininhibitor (21.5 kDa) und Lysozym (14.4 kDa). Waren die Gele für Western Blot-Analysen oder Elektroelution vorgesehen, wurde ein gefärbter „prestained low molecular weight marker“ (Biorad) mitgeführt.

6.2 Zweidimensionale SDS-PAGE

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden die Proteine in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung (IEF) entsprechend ihrer Ladung aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgt die Trennung nach Molekulargewicht mittels SDS-PAGE. Die Kombination dieser beiden Verfahren führt zu einer hochauflösenden Auftrennung und ermöglicht so eine detaillierte Analyse einzelner Proteine eines Proteingemisches.

Die IEF wurde in immobilisierten pH-Gradienten (Polyacrylamid-Gel auf Polyesterstreifen), mit Material und Geräten von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Je Ansatz wurden 2 mg lyophilisiertes TLA in 430 µl Probenpuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % CHAPS, 1 % DTT, 2 % IPG-Puffer pH 3-10 NL, 0.025 % Triton-X 100, Bromphenolblau; nach Rabilloud *et al.* 1997) gelöst. Die Fokussierungsstreifen (Immobiline DryStrip 18 cm, pH 3-10 NL) wurden in die gelöste Probe eingelegt, mit „DryStrip Coverfluid“ bedeckt und über Nacht bei RT rehydriert. Anschließend wurden die Streifen in der „Multiphor II-Elektrophoresekammer“ mit ihrem sauren Bereich zur Anode ausgerichtet und mit „DryStrip Coverfluid“ bedeckt. Die Fokussierung erfolgte bei 25°C mit einer maximalen Spannung von 3000 V (Stromversorger EPS 3500 XL). Die Spannung wurde in 12 Teilschritten so erhöht, dass ein Grenzwert von 50 µA/Streifen nicht überschritten wurde. Eine typische IEF verlief in folgenden Stufen: In 2 h von 0 auf 60 V, in 90 min von 60 auf 150 V, in 4 h von 150 auf 300 V, in jeweils 10 min von 300 auf 600/900/1200 V, in 16 h von 1200 auf 1500 V, in jeweils 10 min von 1500 auf 1800/2100/2400/2700 V und in 48-72 h von 2700 auf 3000 V. Nach 120-150 kWh wurde die IEF beendet und die Streifen bei -80°C gelagert.

Für eine Auftrennung nach Molekulargewicht mittels SDS-PAGE müssen die Proteine eine negative Ladung tragen. Dazu wurden die Streifen für jeweils 15 min in SDS-haltigem Equilibrierungspuffer I und II equilibriert:

Equilibrierungspuffer I: 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 10 % 0.5 M Tris-HCl pH 8.5, Bromphenolblau, 1 % DTT

Equilibrierungspuffer II: 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 10 % 0.5 M Tris-HCl pH 8.5, Bromphenolblau, 4.8 % Iodacetamid

Anschließend wurde je ein Streifen auf das Sammelgel eines 12 %igen, 1,5 mm dicken Polyacrylamidgels gelegt und mit Agaroselösung (1 % Agarose, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.2 % SDS) überschichtet. Die Elektrophorese (vgl. II.6.1) wurde mit 100 V im Sammelgel und mit

250 V im Trenngel durchgeführt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele Coomassie-gefärbt (vgl. II.6.3.1) und geblottet (vgl. II.9.2).

6.3 Färbung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel

6.3.1 Coomassie-Färbung

Das Prinzip der Coomassie-Färbung beruht auf der Anlagerung des Farbstoffes an die NH₂-Gruppen von Proteinen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für mindestens 3 h, zumeist jedoch über Nacht, bei RT in Coomassie-Färbelösung (0.1 % Coomassie Brilliant Blau R-250 in 40 % Ethanol, 7.5 % Essigsäure) geschwenkt. Die Hintergrundfärbung der Gele wurde in Entfärbelösung (20 % Ethanol, 7.5 % Essigsäure) entfernt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 200-400 ng Protein je 5 mm breiter Bande.

6.3.2 Imidazol-SDS-Zink-Färbung

Bei der Imidazol-SDS-Zink-Färbung führt die Einlagerung von Imidazol-Zink-Komplexen in die proteinfreien Bereiche der Gele zur Trübung des Hintergrundes. Proteinhaltige Areale werden nicht getrübt und stellen sich transparent dar. Die Gele wurden zunächst 5 min in 1 %iger Na₂CO₃-Lösung equilibriert, dann 15 min in einer Lösung aus 0.2 M Imidazol und 0.1 M SDS inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in *Aqua dest.* wurden die Gele etwa 30 sec in 0.2 M Zinksulfat geschwenkt, bis der Hintergrund deutlich getrübt war. Transparente Proteinbanden wurden ausgeschnitten, elektroeluiert und als Antigen zur Immunisierung bzw. in Proliferationstests eingesetzt. Im Gegensatz zu Coomassie-gefärbten Geleluaten wirken diese Eluate auch in höheren Konzentrationen nicht zytotoxisch.

7 Reinigung von GRA7

GRA7 wurde für die Immunisierung von Mäusen, mit dem Ziel der Herstellung GRA7-spezifischer monoklonaler Antikörper, gereinigt. Für die effektive Immunisierung einer Maus sind mehrfache Injektionen von 5-50 µg eines löslichen Antigens notwendig (Harlow u. Lane 1988). Das Protein wurde aus *Toxoplasma*-FrenchPress-Lysat (TFL) mittels Immunoaffinitätschromatographie oder Elektroelution aus Proteingelen gereinigt.

7.1 Immunoaffinitätschromatographie

Die affinitätschromatographische Reinigung von GRA7 wurde mit Hilfe des „Carbo Link-Systems“ der Firma Pierce durchgeführt. Nach Herstellervorschrift wurden zunächst 10 mg des GRA7-spezifischen mAk TxE2 oxidiert, entsalzen und an die Agarosematrix der Affinitätssäule gekoppelt. Die verwendete Matrix besitzt zur Verringerung sterischer Behinderungen exponierte Hydrazid-Seitenketten als Abstandhalter. Dadurch ist es möglich, die oxidierten Kohlenhydratreste des Fc-Teils der Immunglobuline kovalent zu koppeln, ohne die Antigenbindung zu behindern. Zur Kontrolle der Kopplungseffizienz wurde der Proteingehalt der Ausgangslösung der Antikörperpräparation mit dem des Säulenauslaufs und der gesammelten Waschlösung nach der Inkubation mit der Säulenmatrix verglichen.

Für den affinitätschromatographischen Reinigungsprozess wurde das Herstellerprotokoll modifiziert. Zunächst wurde die antikörpergekoppelte Säule (2 ml) mit Equilibrierungspuffer

(8 ml) gefolgt von PBS (8 ml) equilibriert. Anschließend wurden durchschnittlich 2 mg TFL in PBS (2-4 ml), über Nacht bei 4°C in einem geschlossenen Kreislauf, auf die Säule aufgetragen. Freies Protein wurde durch mehrfaches Spülen mit 1 M NaCl (10 ml) und PBS (4 ml) ausgewaschen. Gebundenes Antigen wurde mit 0.1 M Glycin pH 2.5 in 20 Einzelfractionen je 500 µl eluiert. Die Eluate wurden umgehend mit 1 M Tris pH 9.5 (50 µl/500 µl Eluat) neutralisiert und dann bei -80°C gelagert.

Zur Kontrolle der Spezifität der Aufreinigung wurde in Ausgangsmaterial und Eluaten mittels ELISA der Gehalt an *T. gondii*-Antigenen, insbesondere GRA7 und SAG1, vergleichend bestimmt. Trotz des hohen Zeit- und Materialaufwandes konnte mit dieser Methode nur sehr wenig gereinigtes GRA7 gewonnen werden (vgl. III.2.1.2). Aus diesem Grunde wurde GRA7 im weiteren Verlauf durch Elektroelution aus SDS-Polyacrylamidgelen angereichert.

7.2 Elektroelution aus SDS-Polyacrylamidgelen

Nach Auftrennung von TFL mittels eindimensionaler SDS-PAGE wurde GRA7 aus Polyacrylamidgelen elektroeluiert. Die Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau der Elutionskammer und das Prinzip der Elektroelution.

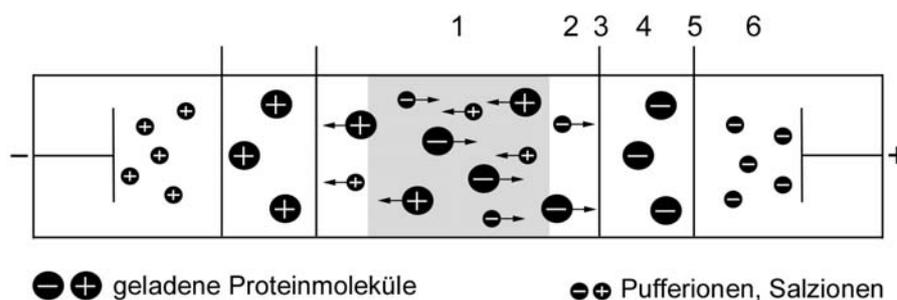


Abb. 3: Prinzip der Elektroelution

Geladene Proteinmoleküle wandern im elektrischen Feld aus dem Gel (1) in den Kammerpuffer (2). Die Proteine passieren den Vorfilter (3) und werden in der Proteinfalle (4) durch eine Membran (5) zurückgehalten. Geladene Teilchen mit einem Molekulargewicht unterhalb von 5 kDa, wie z.B. Pufferionen und Salzionen, passieren diese Membran und akkumulieren im Bereich vor den Elektroden (6).

In einem präparativen Polyacrylamid-Gel (12 %, 1.5 mm) wurde durchschnittlich 1 mg TFL elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden mit Imidazol-Zink-SDS gefärbt und der Bereich von etwa 28-32 kDa anhand eines gefärbten Molekulargewichtsstandards lokalisiert und ausgeschnitten. Anschließend wurden die Gelstücke 10 min in Elutionspuffer (15 mM Ammoniumhydrogencarbonat) equilibriert. Der Elutionspuffer besitzt nur eine geringe Pufferkapazität, bietet aber neben seiner Flüchtigkeit beim Lyophilisieren den Vorteil, dass das Eluat frei ist von Tris, Glycin und anderen im Gel enthaltenen Ionen.

Die Elution wurde über 2 x 4 h bei 200 V bzw. über Nacht bei 100 V unter regelmäßiger Durchmischung des Elutionspuffers in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Schleicher & Schuell) durchgeführt. Um die Proteine von der Membran zu lösen, wurde das System nach Beendigung der Elution für etwa 20 sec bei 200 V umgepolt. Die verbliebenen Gelstücke wurden zur Kontrolle der Elutionseffizienz Coomassie-gefärbt. Die Eluate wurden bei -80°C gelagert.

Der GRA7-Gehalt der Eluate wurde mittels ELISA (vgl. II.9.1.2) durch Vergleich mit TFL abgeschätzt. Der Proteingehalt der Eluate lag unterhalb der Nachweisgrenze der BCA-Methode. Aus diesem Grunde wurde ein Teil des Eluates über SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel Coomassie-gefärbt und der Proteingehalt der Banden densitometrisch, durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard, ermittelt.

Es zeigte sich, dass die GRA7-Ausbeute bei Elution aus mit Imidazol-SDS-Zink gefärbten Gelen deutlich geringer war als bei Elution aus ungefärbten Gelen. Daher wurden im Verlauf der GRA7-Anreinigung zunächst gefärbte und später ungefärbte Gelstücke eluiert.

8 Herstellung GRA7-spezifischer B-Zell-Hybridome

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das *T. gondii*-Protein GRA7 wurde eine Maus mit gereinigtem nativem und rekombinant hergestelltem GRA7 immunisiert. Durch Fusion mit murinen Plasmazytomzellen wurden antikörperproduzierende B-Zellen dieser Maus immortalisiert. Durch Klonierung der aus der Fusion hervorgegangenen Hybridome wurden die Zellen vereinzelt und damit jene Zellen isoliert, die GRA7-spezifische Antikörper sezernieren.

8.1 Immunisierung

Eine drei Monate alte männliche C57BL/10 Maus wurde mit gereinigtem nativem (n) bzw. rekombinantem (r)GRA7 immunisiert. Das in *Aqua dest.* gelöste Antigen wurde bei der primären Immunisierung zu gleichen Volumenanteilen mit komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA, Sigma; Freund u. Mc Dermott 1942), bei allen weiteren Injektionen mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans (IFA, Sigma) emulgiert und intraperitoneal injiziert. Sieben bis zehn Tage nach jedem *boost* wurde der Maus aus der Schwanzvene Blut entnommen und der Titer der *T. gondii*- bzw. GRA7-spezifischen Serumantikörper mittels ELISA bestimmt. Anhand der Testergebnisse wurde die Anzahl der weiterhin erforderlichen Immunisierungen, sowie der Zeitpunkt der Milzentnahme zur Zellfusion bestimmt. Die Immunisierung verlief nach folgendem Schema:

0. Tag: 9 µg nGRA7 in 150 µl *Aqua dest.* + 150 µl CFA i.p.

32. Tag: 5 µg nGRA7 in 150 µl *Aqua dest.* + 150 µl IFA i.p.

77. Tag: 3 µg nGRA7 in 150 µl *Aqua dest.* + 150 µl IFA i.p.

93. Tag: 3 µg nGRA7 in 150 µl *Aqua dest.* + 150 µl IFA i.p.

112. Tag: 5 µg r GRA7 in 150 µl *Aqua dest.* + 150 µl IFA i.p.

Fünf Tage vor der Fusion wies das Serum der Maus einen GRA7-spezifischen Antikörpertiter von 1:100 auf.

8.2 Zellfusion

Werden Zellen mit hohen Konzentrationen Polyethylenglykol (PEG) behandelt, fusionieren ihre Membranen. Dabei entstehen multinukleäre Zellen, deren Zellkerne bei der nächsten Teilung miteinander verschmelzen können (Köhler u. Milstein 1975).

Die Plasmazytomzelllinie X63-Ag8.653 wurde in IMDM (2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FCS) expandiert. Am Tag der Fusion wurden zunächst Peritonealexsudat-Makrophagen präpariert, in HAT-IMDM aufgenommen und als *feeder cells* mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen/well in einer 96-well Platte ausgesät. Solche *feeder cells* stimulieren durch Sekretion von Zytokinen die Proliferation und Immunglobulinsekretion der B-Zellen. Zudem phagozytieren sie den durch absterbende Zellen entstehenden Debris. Anschließend wurden die Milzzellen der immunisierten Maus

präpariert, und die Plasmozytomzellen wurden geerntet und zweifach in Medium gewaschen. Beide Zellpopulationen wurden in eiskaltem Medium (IMDM, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 % Penicillin/Streptomycin, 15 % FCS) aufgenommen. Zur Zellfusion wurden 3×10^7 Milzzellen und 6×10^7 Plasmozytomzellen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gemischt und in kaltem Medium gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden bei 37°C mit vortemperierten Lösungen durchgeführt.

Über einen Zeitraum von 1 min wurde auf das Zellsediment 1 ml einer 50 %igen PEG-Lösung gegeben. Währenddessen wurde der Ansatz vorsichtig mit einer Glaspipette durchmischt. Nach einer weiteren Minute wurden auf dieselbe Weise 2 ml Medium über 2 min und 8 ml Medium über 6 min zugegeben. Anschließend wurde das Zellgemisch langsam mit 40 ml Medium aufgefüllt. Um einer Zerstörung der neu gebildeten Zellaggregate vorzubeugen, wurde die Zellsuspension während dieser Prozedur nicht resuspendiert. Im Anschluß daran wurde der Fusionsansatz unter gleichmäßiger Beschleunigung zentrifugiert (10 min, 200 g, RT). Das Zellsediment wurde vorsichtig in 40 ml HAT-IMDM aufgenommen und tropfenweise (etwa 100 µl/well) in die 96-well Zellkulturplatten zu den Peritonealexsudat-Makrophagen ausgesät (etwa 7×10^4 Milzzellen/well).

8.3 Selektion der Hybridome

Nach einer Fusion befinden sich neben den Hybridzellen auch nicht fusionierte Milz- und Myelomzellen in der Kultur. Die Milzzellen sterben schnell ab, die Myelomzellen hingegen wachsen ungehemmt weiter. Um ein optimales Wachstum der Hybridomzellen zu gewährleisten, ist es notwendig, diese Zellen zu depletieren.

Native Zellen bilden den überwiegenden Anteil der für die Nukleinsäuresynthese benötigten Purin- und Pyrimidinbasen durch *de novo* Synthese. Über einen alternativen Weg (*salvage pathway*) können auch exogene Basen genutzt werden. Die zur Fusion verwendeten Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 können aufgrund eines Defektes der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) im *salvage pathway* Nukleotide ausschließlich durch *de novo* Synthese herstellen. Bei Blockade dieses Syntheseweges sterben die Zellen ab. Durch Fusion der HGPRT-defizienten Myelomzellen mit B-Zellen entstehen Hybridome mit der intakten HGPRT der B-Zellen und der Teilungsfähigkeit der Myelomzellen. Solche Zellen können durch Verwertung von Hypoxanthin und Thymidin auch bei Blockade des Hauptsyntheseweges durch den Folsäureantagonisten Aminopterin im HAT-Selektionsmedium überleben. Myelomzellen hingegen sterben aufgrund ihres Enzymdefektes ab.

Die Hybridome wurden bis zum 10. Tag nach der Fusion in HAT-Medium kultiviert. Nach dieser Selektionsphase wurden sie zur Ausverdünnung des Aminoptेरins für 2-3 Wochen in IMDM-Medium kultiviert. Durch schrittweises Absenken der HAT-Konzentration wurde den Zellen die Umstellung auf den Hauptsyntheseweg erleichtert. Gleichzeitig wurde der FCS-Gehalt im Medium allmählich von 15 % auf 5 % gesenkt, um den Anteil an unspezifischen Proteinen, d.h. Nicht-Immunglobulinen, im Kulturüberstand zu reduzieren. Sobald die Zellkolonien mehr als 50 % des Bodens im well bedeckten, wurde zellfreier Kulturüberstand entnommen und mittels ELISA (vgl. II.9.1.2) auf ein Vorhandensein *T. gondii*-spezifischer Antikörper getestet. In solchen Kolonien können sich antikörperproduzierende Zellen verschiedener Klone befinden. Um die einzelnen Zellklone bzw. deren Antikörper getrennt voneinander untersuchen zu können, wurden die Hybridome kloniert sobald die Zellen in den 96er wells nahezu den gesamten Boden bedeckten.

8.4 Klonierung

Zur Gewinnung monoklonaler B-Zell-Hybridome wurden die antikörperproduzierenden Zellen durch Grenzverdünnung vereinzelt (Henry *et al.* 1980). Durch möglichst frühzeitige Klonierung der Zellen soll ein Überwachsen antikörperproduzierender Klone durch nicht produzierende Klone verhindert werden.

Vor der Klonierung wurde die Zahl der lebenden Hybridomzellen in zwei Verdünnungsstufen bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in mit einer Zelldichte von 30, 10, 3, 1 und 0.3 Zellen/well in 96-well Mikrotiterplatten pipettiert. Nach einer Woche wurden die Klonierungskulturen regelmäßig auf Zellwachstum überprüft. Überstände von Kulturen, die mehr als die Hälfte des Bodens im well bedeckten, wurden mittels ELISA (vgl. II.9.1.2) bezüglich ihres Gehaltes an *T. gondii*-spezifischen Antikörpern und möglicher Kreuzreaktivitäten untersucht. Anschließend wurde die Reaktivität antikörperhaltiger Überstände im Western Blot (vgl. II.9.2) überprüft. Antikörperproduzierende Klone wurden von 48- über 24-well Zellkulturplatten bis in 25 cm² Zellkulturflaschen expandiert und anschließend kryokonserviert.

8.5 Produktion von Hybridomkulturüberstand

Zur Produktion antikörperhaltiger Zellkulturüberstände wurden die Hybridomzellen zunächst in IMDM (5 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 M Natriumpyruvat, 2 % Penicillin/Streptomycin und 0.1 % IL-6) in 24-well Zellkulturplatten oder 25 m² Zellkulturflaschen expandiert. Während der Expansionsphase wurde regelmäßig alle 2-3 Tage das Medium gewechselt. Sobald die Zellen den Boden der wells vollständig bedeckten, wurde kein Mediumwechsel mehr vorgenommen, sondern lediglich frisches Medium zugegeben. Wenn die maximale Zelldichte erreicht war, wurde kein frisches Medium mehr zugegeben. Um Kulturüberstände mit möglichst hohem Antikörpergehalt zu gewinnen, wurden die Kulturen täglich resuspendiert und bis zum Farbumschlag des Indikators im Medium bzw. bis zum beginnenden Absterben der Zellen (nach etwa 7-10 Tagen) inkubiert. Die Überstände wurden durch Zentrifugation (10 min, 200 g und 20 min, 600 g, 4°C) von Zellen und Debris befreit, mit 0.2 % Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert. Die Kultivierung der Hybridome TxE2 und Tx34.31 erfolgte analog.

8.6 Fällung von Immunglobulin

In Lösung befindliche Proteine können durch Zugabe von Ammoniumsulfat gefällt werden. Dabei ist die zur Fällung notwendige Salzkonzentration u.a. abhängig von dem Molekulargewicht und dem *pI* der Proteine. Murine Antikörper präzipitieren, im Gegensatz zu vielen anderen Serumbestandteilen, bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von etwa 50 % (Harlow u. Lane 1988).

Zur Herstellung eines Antikörperkonzentrates wurde zellfreier Hybridomkulturüberstand zunächst durch Zentrifugation (3000 g, 30 min) von Zelldebris befreit. Anschließend wurden unter Rühren kleinste Portionen Ammoniumsulfat in den Überstand gegeben bis eine Salzkonzentration von 50 % erreicht war. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Salzkristalle unverzüglich in Lösung gingen und sich kein Bodensatz bildete. Auf diese Weise wurde eine starke lokale Erhöhung der Salzkonzentration in der Lösung und damit eine unerwünschte Präzipitation von FCS-Bestandteilen verhindert. Die eigentliche Fällung der Antikörper wurde bei 4°C über Nacht, unter ständigem Rühren, durchgeführt. Im Anschluß daran wurde der gesamte Ansatz zentrifugiert (3000 g, 30 min, 4°C) und das Sediment zweifach in eiskalter 50 %iger Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen (3000 g, 30 min, 4°C).

Für den Entsalzungsprozeß wurde das Pellet in 1 ml sterilem PBS aufgenommen und auf eine mit 10 ml 10 mM NaPO₄-Lösung equilibrierte „NAP-10-Säule“ (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Antikörper wurden mit 2 x 1 ml *Aqua dest.* eluiert. Die Eluate wurden mit 0.02 % Natriumazid versetzt und bei -20°C gelagert. Die optimale Arbeitsverdünnung der Antikörperpräparationen wurde mittels ELISA bestimmt.

9 Methoden der Antigencharakterisierung

9.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mittels ELISA wurden die Antigenzusammensetzung von Proteingemischen, die Antikörpertiter von Seren und Antikörperpräparationen (Hybridomkulturüberstände, gereinigte Antikörper, Aszites) sowie die Isotypen monoklonaler Antikörper bestimmt. Bei diesem Verfahren wird ein Antigen bzw. ein spezifischer Antikörper an die Oberfläche spezieller Mikrotiterplatten gekoppelt (Festphase). Die spezifische Bindung des in der Probe nachzuweisenden Antikörpers bzw. Antigens an die Festphase kann dann mit enzymgekoppelten Sekundäntikörpern über eine enzymatische Farbreaktion detektiert werden.

9.1.1 Isotypisierung monoklonaler Antikörper

Die Immunglobulinklassen und IgG-Subklassen monoklonaler Antikörper wurden mit dem „Mab-based Mouse Ig Isotyping Kit“ (PharMingen, San Diego, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Dieser Test basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. In einer 96-well Mikrotiterplatte (MaxiSorp 96F, Nunc) wurden isotypspezifische anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper angelagert. Anschließend wurde die beschichtete Platte mit der zu typisierenden Antikörperpräparation inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem alkalischen Phosphatase gekoppelten Ratte-anti-Maus-Antikörper detektiert. Nach enzymatischem Umsatz des chromogenen Substrates Tetramethylbenzidin wurde die Intensität der Farbreaktion photometrisch bei 405 nm gemessen.

9.1.2 Analyse von Antikörpertiter und Antigenzusammensetzung

Die Antikörpertiter bzw. die Antigenreaktivität von Immunsereen und Präparationen monoklonaler Antikörper, sowie die Antigenzusammensetzung von *Toxoplasma*-Lysaten wurde mittels ELISA untersucht. Zur Titerbestimmung wurde eine konstante Menge Antigen (TLA und TFL: 5-10 µg/well, rGRA7: 6-10 ng/well, GRA7-Peptid: 100 ng/well) in einer 96-well Mikrotiterplatte angelagert. Die zu testenden antikörperhaltigen Präparationen wurden titriert eingesetzt. Bei der Untersuchung der Antigenzusammensetzung wurden die *Toxoplasma*-Lysate hingegen titriert angelagert und die jeweilige Antikörperpräparation in konstanter Konzentration, ihrem Titer entsprechend, zugegeben. Kreuzreaktivitäten wurden durch Anlagerung von Kontrollantigenen (FCS, Milchpulver, BSA, L929-Lysat, *E. coli*-Lysat je 1 µg/well) geprüft.

Die Antigenpräparationen wurden in PBS verdünnt und mit 50 µl/well in einer Mikrotiterplatte 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C angelagert. Nicht gebundenes Antigen wurde abgesaugt und die Mikrotiterplatte zur Entfernung überschüssiger Flüssigkeit auf Zellstoff ausgeschlagen. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Freie Proteinbindungsstellen wurden über 1 h mit 200 µl/well Blocklösung (1 % Milchpulver in PBS; Oxoid, Basingstoke, GB) abgesättigt. Anschließend wurden die Seren

bzw. die Primärantikörper in 50 µl Blocklösung zugegeben und für 2 h bzw. über Nacht inkubiert. Nach achtfachem Waschen mit PBS wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (vgl. II.1.5) in 50 µl Blocklösung zugegeben. Nach 1 h wurden nicht gebundene Sekundärantikörper durch achtfaches Waschen mit PBS entfernt. An Primärantikörper gebundene Sekundärantikörper wurden durch den enzymatischen Umsatz des Substrates o-Phenylendiamin nachgewiesen. Der Ansatz wurde über 30 min mit 100 µl/well der Substratlösung (0.1 % o-Phenylendiamin in 0.015 % H₂O₂ und 0.1 M Natriumcitrat pH 5.0) unter Lichtabschluss inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl/well 2 M HCl wurde die Enzymreaktion beendet. Die Menge des gelb gefärbten Produktes wurde photometrisch bei 492 nm bestimmt. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit einer bekannten Antigen-Primärantikörper-Kombination mitgeführt.

Die Hintergrundfärbung wurde mit Negativkontrollen ohne Antigen bzw. ohne Primärantikörper ermittelt. Zur Analyse der Antigenreaktivität wurden Immunsereen mit Präimmunsereen und Hybridomkulturüberstände mit dem Überstand nicht fusionierter Myelomzellen verglichen. Die Auswertung der ELISA-Daten wurde mit Hilfe der „GraphPad Prism-Software“ (GraphPad, San Diego, USA) durchgeführt.

9.2 Western Blot-Analyse

Zum immunchemischen Nachweis von Antigenen in gelelektrophoretisch aufgetrennten *Toxoplasma*-Lysaten wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dabei werden die Proteine aus dem Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

9.2.1 Proteintransfer auf Nitrozellulose

Der Elektrotransfer mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen wurde in Anlehnung an das Verfahren von Kyhse-Andersen (1984) durchgeführt. Dazu wurde ein Gel-Membran-Sandwich mit puffergetränkten Filterpapieren zwischen die beiden Flächenelektroden einer „Semi Dry Western Blot-Kammer“ gelegt und die Proteine im elektrischen Feld transferiert. Je drei Filterpapiere (Whatman 3MM; Whatman, Maidstone, GB) in der Größe des Gels wurden mit Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % Methanol), Anode I-Puffer (30 mM Tris, 20 % Methanol) oder Anode II-Puffer (300 mM Tris, 20 % Methanol) getränkt. Eine Nitrozellulose-Membran der gleichen Größe (Protran 0.45 µm; Schleicher & Schüll) wurde in Anode I-Puffer getränkt. Unmittelbar nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Filterpapiere, das Polyacrylamid-Gel und die Nitrozellulose-Membran in folgender Reihenfolge luftblasenfrei in der Western Blot-Kammer übereinander geschichtet:

Deckplatte (Anode)
≡≡≡ drei Filterpapiere, getränkt in Anode II-Puffer
≡≡≡ drei Filterpapiere, getränkt in Anode I-Puffer
--- Nitrozellulose-Membran, getränkt in Anode I-Puffer
Polyacrylamid-Gel
≡≡≡ drei Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer
Bodenplatte (Kathode)

Der Proteintransfer erfolgte mit 0.8 mA/cm² Gelfläche über 30 min bei 0.5 mm dicken Gelen und über 60 min bei 1.5 mm dicken Gelen.

9.2.2 Immunchemischer Antigennachweis

Nach dem Proteintransfer wurden freie Bindungsstellen auf der Blotmembran durch Inkubation mit 5 % Milchpulver in PBS über 30 min blockiert. Überschüssige Blocklösung wurde über 5 min in PBS ausgewaschen. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler durchgeführt und durch dreifaches Waschen mit PBS über jeweils 5 min beendet. Die Membran wurde zunächst mit Primärantikörpern und im Anschluß daran mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Beide Antikörperpräparationen wurden zuvor, ihrem Titer entsprechend, in Blocklösung verdünnt. Gebundene Sekundärantikörper wurden über eine Enzymreaktion nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mit dem „Super Signal Chemolumineszenz-Substrat“ (Pierce) entsprechend der Herstellerangaben inkubiert. Durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase wird das Substrat Luminol zu einem lumineszierenden Produkt umgesetzt, welches durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak Scientific X-OMAT AR) nachgewiesen werden kann.

War durch sehr stark überstrahlende Lumineszenz eine exakte Lokalisierung des Signals auf dem Röntgenfilm nicht möglich, wurde im Anschluß an das hochempfindliche Chemolumineszenz-Verfahren der deutlich weniger empfindliche Nachweis mit Chloronaphthol-Substrat durchgeführt. Zunächst wurde die Blotmembran dreifach über 5 min in PBS gewaschen, um das Luminol und seine Spaltprodukte zu entfernen. Unter Lichtabschluß wurde die Membran 1 h in Chloronaphthol-Substratlösung (0.1 % 4-Chloro-1-naphthol, 20 % Methanol, 0.015 % H₂O₂ in PBS) inkubiert und anschließend, zur Intensivierung des Signals, über Nacht bei RT in Leitungswasser gelegt. Das Produkt der Enzymreaktion ist als braun gefärbter Niederschlag direkt auf der Blotmembran sichtbar.

9.2.3 Identifizierung von Antigenen in zweidimensionalen Gelen

Mit Western Blot-Analysen kann ein Protein spezifisch nachgewiesen werden. Durch den Vergleich mit gefärbten Markerproteinen kann anhand der Lage der Signale auf der Blotmembran das apparente Molekulargewicht und der *pI* des Proteins bestimmt werden. Um einen Proteinspot in einem zweidimensionalen Gel als Antigen zu identifizieren, bedarf es einer Proteinfärbung und einer Immundetektion auf derselben Blotmembran. Um das Reaktionsmuster mehrerer GRA7-spezifischer Antikörper direkt miteinander und mit dem Muster der Protein-Spots zu vergleichen, bedarf es mehrerer identischer Blotmembranen. Dazu wurde ein Coomassie-gefärbtes präparatives Gel (1.5 mm) für 15-30 min in 25 % 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS equilibriert und anschließend nacheinander für jeweils 30-45 min auf zwei Nitrozellulose-Membranen geblottet. Dabei wurden die gefärbten Proteine mit identischem Muster auf beide Membranen transferiert.

Anschließend wurde jede Membran mit einem anderen GRA7-spezifischen Primärantikörper inkubiert. Die Proteinfärbung blieb auch nach dem immunchemischen Antigennachweis erhalten. Die Chemolumineszenz-Signale auf den verschiedenen Röntgenfilmen wurden miteinander und mit dem Muster der gefärbten Protein-Spots im identischen Ausschnitt auf der Blotmembran verglichen. Dadurch konnten die durch die verschiedenen Antikörper erkannten Antigenmuster untereinander und mit der Position der entsprechenden Proteine abgeglichen werden.

Um die GRA7-Identität der Antigenspots zu bestätigen, wurden die entsprechenden Coomassie-gefärbten Protein-Spots aus Gelen ausgestanzt und tryptisch verdaut. Aminosäuresequenzen der dabei entstandenen Peptidfragmente wurde mittels Massenspektrometrie analysiert und mit der bekannten Aminosäuresequenz von GRA7 verglichen.

9.3 Kartierung der Epitope monoklonaler Antikörper

Die Kartierung der Epitope der verschiedenen GRA7-spezifischen monoklonalen Antikörper wurde nach dem SPOTS-Verfahren (Frank und Döring 1988) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Teilsequenzen des zu untersuchenden Proteins auf einer Nitrozellulose-Membran synthetisiert. Mittels Immundetektion wird ermittelt, mit welchen Peptiden ein antigenspezifischer monoklonaler Antikörper reagiert.

Zur Kartierung von Epitopen auf der GRA7-Sequenz wurde eine Nitrozellulose-Membran mit 76 Peptiden (Jerini, Berlin, D) verwendet. Die Peptide hatten eine Länge von 13 Aminosäuren und deckten, bei einer N- bzw. C-terminalen Überlappung von jeweils drei Aminosäuren, die gesamte GRA7-Sequenz ab. Als Positivkontrolle wurde ein Peptid mit der bekannten Aminosäuresequenz des Epitopes des GRA4-spezifischen mAk Tx34.31 verwendet. Als Negativkontrolle dienten zwei dieses Epitop flankierende Peptide. Die Membran wurde 10 min in Methanol vorgequollen und dann dreifach für 10 min in *Tris buffered saline* (TBS 10fach Konzentrat: 0.5 M Tris, 1.37 M NaCl, 26 mM KCl pH 8.0) gewaschen. Freie Protein-Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit „Western Blocking Reagent“ (Boehringer Mannheim) mit 5 % Saccharose über 1 h blockiert. Überschüssige Blocklösung wurde durch Spülen in TBS mit 0.05 % Tween 20 über 3 min entfernt. Die Membran wurde 3 h bei RT mit in Blocklösung verdünnter Primärantikörperlösung inkubiert und anschließend dreifach für 10 min in TBS gewaschen.

Die gebundenen Antikörper wurden von der Nitrozellulose-Membran auf PVDF-Membranen (Polyvinylidendifluorid-Membran, Millipore) geblottet. Der Transfer erfolgte mit 0.8 mA/cm^2 Membranfläche über 30 min. Um die Antikörper vollständig von den Peptiden auf der Nitrozellulose-Membran zu entfernen, wurde der Blotvorgang fünffach aufeinanderfolgend mit verschiedenen PVDF-Membranen wiederholt. Durch diese Vorgehensweise wurde die Peptid-beladene Membran regeneriert, und es war möglich mehrfache Epitopkartierungen mit einer Nitrozellulose-Membran durchzuführen. Nach dem Blotvorgang wurde die Nitrozellulose-Membran zunächst dreimal für 5 min in TBS mit 0.05 % Tween 20, dann 5 min in TBS gewaschen und nach kurzem Spülen in Methanol bei -20°C gelagert. Auf allen fünf PVDF-Membranen wurde der gebundene Antikörper mit Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG/IgM-Sekundärantikörpern immunchemisch nachgewiesen.

10 Analyse der Aminosäuresequenz

Die GRA7-Identität der durch verschiedene anti-GRA7 Antikörper erkannten Protein-Spots wurde mittels „Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionisation-Analyse“ (MALDI; Hillenkamp 1975) überprüft. Bei diesem Verfahren werden Proteine in die Kristallstruktur einer UV-absorbierenden Matrix eingebaut. Aus diesen Matrix-Protein-Mischkristallen werden durch Bestrahlung mit einem UV-Laserpuls Moleküle freigesetzt, die im Hochvakuum des Massenspektrometers durch Protonenübertragung von der stark sauren Matrix ionisiert werden. Die positiv geladenen Proteinionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und im angeschlossenen Flugzeitanalysator (TOF = *time of flight*) analysiert. Die Flugzeit ist abhängig von Masse und Ladung der Proteinmoleküle. Das bedeutet, die Proteine werden nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis getrennt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 1-10 pM Protein.

Für die MALDI-TOF-Analyse wurden Protein-Spots aus Coomassie-gefärbten Gelen angestochen. Durch Inkubation der Gelstücke mit Trypsin wurden die Proteine in Peptide

gespalten. Anschließend wurden die Peptide aus den Gelstücken eluiert und mittels „ZipTip-Säule“ (Millipore) entsalzt. Mit Hilfe eines MALDI-TOF-Massenspektrometers wurden die Molekulargewichte der Spaltprodukte ermittelt und mit den Massen möglicher tryptischer Fragmente von GRA7 verglichen. Die Sequenzanalyse wurde von Dr. Sabine Metzger im Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für uns durchgeführt.

11 Methoden zur Analyse der Immunantwort im Gehirn

11.1 Präparation von Liquor

Adulten NMRI-Mäusen wurden drei Zysten des Isolates DX intraperitoneal injiziert. War die Infektion serologisch bestätigt, wurde den Mäusen sechs Wochen p.i. Liquor entnommen. Für die Präparation des Liquors wurden die Mäuse zur Schonung des Spinalkanals nicht durch Genickbruch, sondern in CO₂-gesättigter Atmosphäre getötet. Eine Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke bzw. eine Kontamination des Liquors durch Blut wurde auf diese Weise verhindert. Die Mäuse wurden in maximaler Beugstellung der Halswirbelsäule fixiert, um einen optimalen Zugang zur Nackenregion zu ermöglichen. Zunächst wurden Haut und Muskelschichten im Bereich des Hinterhauptes entfernt. Unter Zuhilfenahme eines Auflichtmikroskopes (30fache Vergrößerung) wurde die *Dura mater* freigelegt und mit einer Kanüle angeritzt, ohne die im Präparationsgebiet liegenden Blutgefäße zu verletzen. Mit einer dünnen Kunststoffhohlnadel (MicroFil, MF34G canula WPI, Sarasota, USA) wurden aus der *Cisterna cerebellomedularis posterior* bis zu 12 µl Liquor entnommen. Zur Detektion präparationsbedingter Blutbeimengungen wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 10000 g, RT) und das Sediment lichtmikroskopisch auf Kontamination mit Erythrozyten überprüft. Mittels ELISA wurden die Liquores und die entsprechenden Seren, auf ihren Gehalt an *T. gondii*- bzw. GRA7-spezifischen Antikörpern untersucht.

11.2 Isolierung CD4-positiver Gehirnzellen

Adulte BALB/c Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von fünf Zysten des *T. gondii*-Isolates DX infiziert. War die Infektion serologisch bestätigt, wurden aus den Gehirnen der Tiere CD4-positive Zellen isoliert.

Zunächst wurde aus der Gesamthirnzellpräparation (vgl. II.3.4) über einen Percoll-Gradienten die Fraktion der mononukleären Zellen isoliert. Dazu wurden die Zellen in 20 ml einer 60 %igen Percoll-Lösung (in PBS 10fach-Konzentrat, pH 6.6) aufgenommen, mit 20 ml einer 30 %igen Percoll-Lösung überschichtet und zentrifugiert (25 min, 1000 g, RT, ungebremst). Nach Absaugen der an der Oberfläche schwimmenden Myelinschicht wurden die Zellen der Interphase entnommen und zweifach mit 40 ml Medium (IMDM) gewaschen (15 min, 200 g, 4°C). Die Zellausbeute betrug, je nach Infektionsstatus der Mäuse, zwischen 0.3×10^6 Zellen/Gehirn (nicht infizierte BALB/c) und $4-6 \times 10^6$ Zellen/Gehirn (BALB/c, vier Wochen p.i.). Aus so gewonnenen mononukleären Hirnzellen wurde über „miniMACS Magnetic Cell Sorting“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) die Population der CD4-positiven Zellen isoliert. Bei diesem Verfahren binden an Magnetpartikel gekoppelte Antikörper an die CD4-Rezeptoren der Zellen. In einer Separationssäule werden diese Zellen durch ein magnetisches Feld zurückgehalten, während nicht markierte Zellen die Säule passieren. Die in der Säule zurückgehaltenen CD4-positiven Zellen werden dann außerhalb des Magnetfeldes eluiert.

Für die Separation in einer Säule wurden bis zu 1.2×10^7 Gehirnzellen in 450 μ l Separationspuffer (PBS pH 7.2, 0.5 % BSA, 5 mM EDTA) aufgenommen, mit 50 μ l an anti-CD4-Antikörper gekoppelten „MicroBeads“ versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension innerhalb des Magnetfeldes auf die equilibrierte Säule aufgetragen. Die Equilibrierung, die Waschschrte und die Elution erfolgten gemäß Herstellerprotokoll. Vor der Separation CD4-positiver Zellen wurde aus den mononukleären Zellen für weitere Analysen innerhalb der Arbeitsgruppe die Population CD11c-positiver Zellen isoliert. Die Ausbeute an CD4-positiven Zellen lag zwischen 2.4 % (5.5×10^4 Zellen/BALB/c, nicht infiziert) und 3.3 % (4×10^5 Zellen/BALB/c, 4 Wochen p.i.) der mononukleären Gehirnzellen. Analog wurden CD4-positive Milzzellen isoliert.

11.3 Analyse der Aktivierung CD4-positiver Gehirnzellen

Bei Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen, die ein spezifisches Antigen präsentieren, proliferieren CD4-positive T-Zellen. Die Proliferation läßt sich durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA sich teilender Zellen messen. Nach Aktivierung sezernieren CD4-positiv T-Zellen Zytokine. In dieser Arbeit wurde die antigenspezifische Aktivierung CD4-positiver Gehirnzellen einerseits durch Messung der Zellproliferation und andererseits, in Erwartung einer Typ1-Antwort, durch Messung der IFN- γ -Sekretion untersucht.

11.3.1 Messung der Zellproliferation

Zur Messung der *T. gondii*-spezifischen proliferativen Zellantwort wurden je 2.5×10^4 CD4-positiv Gehirnzellen mit 10^5 bestrahlten syngenem Milzzellen und TLA (30-1 μ g/ml) in 100 μ l Medium (IMDM, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 % Penicillin/Streptomycin, 5 % FCS) in 96-well A/2-Zellkulturplatten ausgesät. Kontrollkulturen wurde kein Antigen zugesetzt. Nach 48 h wurden je 50 μ l Kulturüberstand entnommen und durch 50 μ l frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Testansätze mit 0.2 μ Ci/well Methyl- ^3H -Thymidin pulsmarkiert und nach weiteren 18-20 h Kultivierung bei -80°C eingefroren. Das weitere Vorgehen entsprach dem des Toxoplasmen-Proliferationstests (vgl. II.4.2). Für jede Versuchsbedingung wurden zwei Parallelansätze angelegt, deren arithmetisches Mittel \pm SD als Ergebnis angegeben ist.

11.3.2 Messung der Interferon- γ -Sekretion

Die Stimulationsüberstände CD4-positiver Gehirnzellen wurden 48 h nach Beginn der Testkultur mit APC und Antigen entnommen und bis zur Bestimmung des Zytokingehaltes bei -80°C gelagert. Mit Hilfe des InterTest Maus-IFN- γ ELISA (Genzyme, Cambridge, GB) wurde die Interferon- γ -Konzentration der Zellkulturüberstände gemessen. Bei diesem Sandwich-ELISA wird ein gegen murines IFN- γ gerichteter Antikörper als Festphase eingesetzt. Das in der Probe enthaltene IFN- γ wird an die Festphase gekoppelt und nach Bindung eines biotinylierten anti-IFN- γ -Antikörpers, über ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat detektiert. Durch den enzymatischen Umsatz des Substrates Tetramethylbenzidin entsteht ein gelber Farbstoff, dessen Intensität nach Beendigung der Enzymreaktion durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure photometrisch bei 450 nm gemessen wird. Bei der Auswertung der Analysen wurden die Extinktionswerte der mitgeführten Standardverdünnungen gegen deren IFN- γ -Konzentration aufgetragen. Aus der daraus resultierenden Regressionsgeraden wurde mit Hilfe der Software Prism 2.01 die IFN- γ -Konzentration der Proben ermittelt.

III. Ergebnisse

1 Nachweis einer GRA7-spezifischen Immunantwort in der chronischen Phase der Infektion

Die von *T. gondii* sezernierten Proteine, sogenannte exkretorisch-sekretorische Antigene (ESA), sind starke Stimuli des Immunsystems (Duquesne *et al.* 1990). Das *dense granule* Protein GRA7 ist ein ESA, welches von *T. gondii*-Isolaten aus allen drei spezie-internen Gruppen exprimiert wird (Stachelhaus 2001). Es wird als einziges *dense granule* Protein von allen infektiösen Formen (Tachyzoiten, Bradyzoiten, Merozoiten, Sporozoiten) exprimiert (Ferguson 1999^a) und es ist das erste bisher bekannte exportierte *Toxoplasma*-Protein (Fischer *et al.* 1998). *In vitro* konnte GRA7 als membranassoziiertes Protein auf der Oberfläche von Wirtszellen nachgewiesen werden (Stachelhaus 2001, Neudeck *et al.* 2002). Alle diese Befunde deuten auf eine Stimulation des Immunsystems durch ausgewählte Antigene intrazellulärer Toxoplasmen.

Da der Parasit während der chronischen Phase der Infektion hauptsächlich im Gehirn des Zwischenwirtes persistiert, wurde die GRA7-spezifische Immunantwort im Gehirn chronisch infizierter Mäuse untersucht. Etwa 2-3 Wochen nach der Infektion mit dem Isolat DX entwickelt sich bei Mäusen eine Enzephalitis mit Ausbildung von Gehirnzysten. Aus chronisch infizierten Mäusen wurden CD4-positive Gehirn-T-Zellen isoliert und anhand der Parameter „Proliferation“ und „Interferon- γ -Produktion“ bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber *Toxoplasma*-Lysat und GRA7 analysiert. Der Liquor der Tiere wurde auf Anwesenheit GRA7-spezifischer Antikörper untersucht.

1.1 Nachweis *T. gondii*-reaktiver T-Zellen im Gehirn

An der Kontrolle einer chronischen *Toxoplasma*-Infektion sind CD4-positive Lymphozyten maßgeblich beteiligt. Durch antigenpräsentierende Zellen (APC) werden sie antigenabhängig zur Proliferation und/oder Zytokinproduktion stimuliert. *In vitro* produzieren Milzzellen infizierter Mäuse nach Stimulation mit *Toxoplasma*-Antigenen IFN- γ und IL-2 (Gazzinelli *et al.* 1991, 1992). Dies ist ein Indiz für eine Typ1-Antwort.

Zum Nachweis einer *T. gondii*-spezifischen T-Zell-Aktivierung im Gehirn wurden aus chronisch infizierten Mäusen CD4-positive Gehirnzellen isoliert und zusammen mit APC und TLA in Proliferationstests kokultiviert. Als Parameter für die Aktivierung der T-Zellen wurde ihre Proliferation und Interferon γ -Sekretion gemessen. CD4-positive T-Zellen aus dem Gehirn zeigten nach Stimulation mit TLA eine antigendosisabhängige Proliferationsantwort. Ein weiteres Indiz für eine Aktivierung der T-Zellen lieferte der Nachweis von Interferon- γ in den Kulturüberständen. Es zeigte sich eine mit sinkender Antigenkonzentration abnehmende Interferon- γ -Konzentration (Abbildung 4).

In Parallelansätzen wurden rekombinantes GRA7 und GRA7-Eluat aus zweidimensionalen Gelen als Antigen eingesetzt. Mit diesen Antigenpräparationen konnte weder bei den CD4-positiven Gehirn-T-Zellen noch bei den CD4-positiven T-Zellen aus der Milz derselben Mäuse eine eindeutige Aktivierung beobachtet werden (ohne Abbildung). Diese Ergebnisse zeigen, dass CD4-positive T-Zellen aus den Gehirnen chronisch infizierter Mäuse durch *T. gondii*-Antigene aktiviert werden. Der Nachweis der IFN- γ -Produktion zeigt, dass in der *Toxoplasma*-reaktiven Population T_H1-Zellen aktiviert werden.

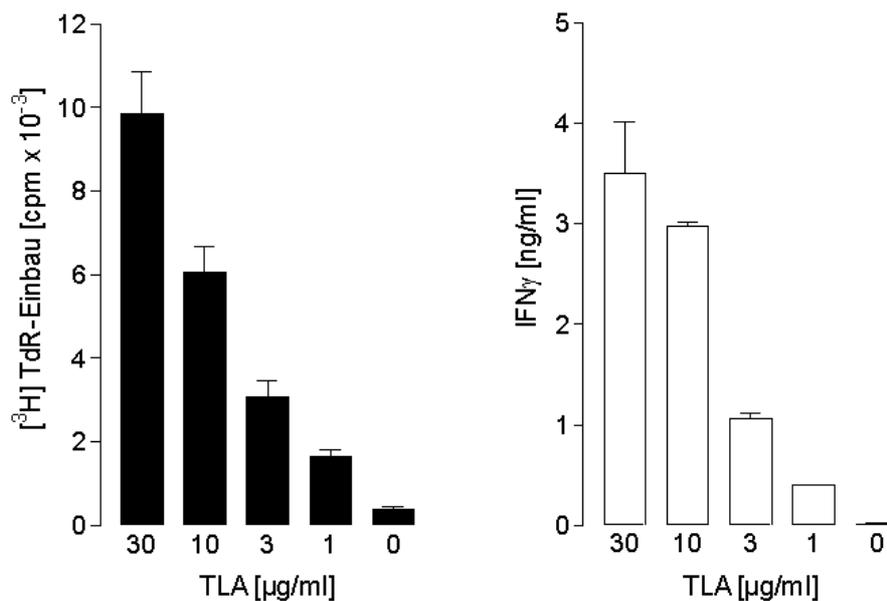


Abb. 4: Aktivierung CD4-positiver Gehirn-T-Zellen durch APC und TLA

Vier Wochen nach i.p. Infektion mit jeweils fünf Zysten des Isolates DX wurden aus den Gehirnen von fünf BALB/c Mäusen, mittels „Magnetic Cell Sorting“ (vgl. II.11.1), die CD4-positiven T-Zellen isoliert. In einem Proliferationstest (vgl. II.11.2) wurden die Gehirn-T-Zellen ($2.5 \times 10^4/\text{well}$) zusammen mit bestrahlten Milzzellen ($10^5/\text{well}$) und TLA (1-30 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert. Nach 48 h wurden Kulturüberstände entnommen und die Testkulturen mit ^3H -Thymidin pulsmarkiert. Nach weiteren 18 h wurde die Proliferation der Gehirn-T-Zellen (■) über den Einbau von ^3H -Thymidin gemessen. Der IFN- γ -Gehalt der Kulturüberstände (□) wurde mittels ELISA (vgl. II.11.2.2) ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus 2 Parallelkulturen. Die Kontrollansätze ohne Antigen bzw. ohne T-Zellen zeigten einen Hintergrund von 400 cpm bzw. < 100 pg IFN- γ/ml .

1.2 Nachweis GRA7-spezifischer Antikörper im Liquor

Da in Gehirnen chronisch infizierter Mäuse eine GRA7-spezifische T-Zell-Antwort nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde nach einer GRA7-spezifischen intrazerebralen B-Zell-Antwort als Indiz für eine T-Zell-Aktivierung gesucht. Dazu wurden Liquor und Serum von Mäusen sechs Wochen nach Infektion mittels ELISA auf die Anwesenheit *T. gondii*- bzw. GRA7-spezifischer Antikörper untersucht.

Sowohl in den Liquores als auch in den korrespondierenden Seren der Mäuse war eine Reaktivität gegenüber TLA und rekombinantem GRA7 nachweisbar. Bei einer Verdünnung von 1:8100 war die Reaktivität *Toxoplasma*-spezifischer im Serum unverändert hoch, im Liquor war in dieser Verdünnungsstufe nur noch ein Drittel der initialen Reaktivität meßbar. GRA7-spezifische Antikörper waren im Liquor bis zu einer Verdünnung von 1:900 nachweisbar, im Serum jedoch nur bis zu einer Verdünnung von 1:100 (Abbildung 5).

Aufgrund der sehr geringen Liquormengen (max. 12 $\mu\text{l}/\text{Maus}$) konnte eine Berechnung des Delpech-Lichtblau-Quotienten ($Q = \text{IgG}_{\text{Liquor}} \times \text{Albumin}_{\text{Serum}} / \text{IgG}_{\text{Serum}} \times \text{Albumin}_{\text{Liquor}}$) zur Unterscheidung von intra- und extrathekalen Immunglobulinproduktion nicht durchgeführt werden. Das Ergebnis des ELISA wurde durch Western Blot-Analysen bestätigt. Gegen eine Blut-Hirnschrankenstörung als Ursache für das Auftreten der *T. gondii*- bzw. GRA7-spezifischen Antikörper im Liquor sprechen unterschiedliche Bandenmuster von Liquor und Serum im eindimensionalen Western Blot (Stachelhaus 2001, Neudeck *et al.* 2002).

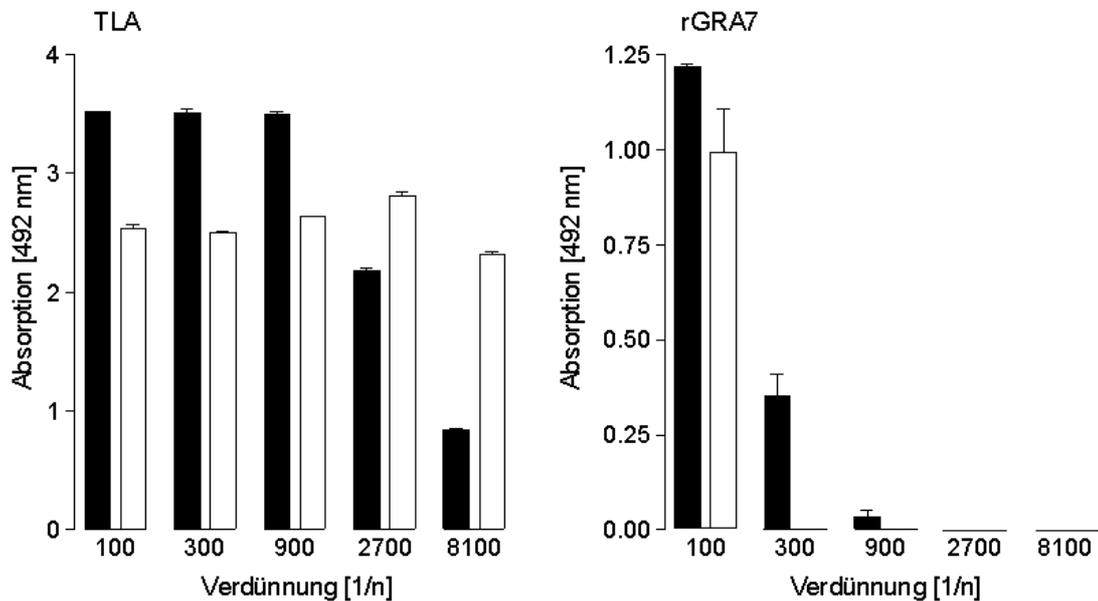


Abb. 5: Nachweis GRA7-spezifischer Antikörper im Liquor chronisch-infizierter Mäuse

Sechs Wochen nach i.p. Infektion mit drei Zysten des *T. gondii*-Isolates DX wurde NMRI Mäusen Liquor (■) und Serum (□) entnommen. In einem ELISA (vgl. II.9.1.2) wurde die Reaktivität der Proben gegenüber GRA7 und *Toxoplasma*-Lysat untersucht. Als Antigene wurden rGRA7 (10 ng/well) und TLA (10 µg/well) von 1:100-1:8100 titriert angelagert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von 2 Parallelansätzen einer Analyse. Kontrollen ohne Antigen wurden als Leerwert (0.070) von den Analysenwerten der Proben abgerechnet. Liquor und Serum einer nicht infizierten Maus reagierten weder mit rGRA7 noch mit TLA.

2 Reinigung von GRA7 aus *Toxoplasma*-Lysat

Der in unserer Arbeitsgruppe etablierte mAk TxE2 erkennt GRA7, ein *dense granule* Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 29 kDa (Fischer *et al* 1998), das *in vitro* von freien Toxoplasmen sezerniert wird (Meisel 1998). Mit dem Ziel, die Antigeneigenschaften und somit die immunologische Bedeutung von GRA7 näher zu untersuchen, wurde das Protein mittels Immunoaffinitätschromatographie oder durch Elektroelution aus Polyacrylamidgelen gereinigt. Das gereinigte Protein wurde zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Das Ziel war die Herstellung neuer GRA7-spezifischer monoklonaler Antikörper.

2.1 Immunoaffinitätschromatographie

Zunächst wurde die Präparationsmethode für *Toxoplasma*-Lysat ermittelt, die zu der höchsten GRA7-Ausbeute führt. Für die affinitätschromatographische Reinigung von GRA7 wurde der mAk TxE2 aus Hybridomkulturüberstand gereinigt und an die Trägermatrix einer Affinitätssäule gekoppelt.

2.1.1 Optimierung der Antigen-Präparation

Der GRA7-Anteil am Gesamtproteingehalt des *T. gondii*-Isolates BK entspricht weniger als 0.5 %. In extrazellulären Toxoplasmen ist das Protein in den *dense granules* und im Bereich des inneren Membrankomplexes lokalisiert (Fischer *et al.* 1998, Bonhomme *et al.* 1998). Mit dem Ziel, eine für die immunoaffinitätschromatographische Reinigung von GRA7 geeignete Antigen-Präparation zu finden, wurden Toxoplasmen durch Einfrier-/Auftau-Zyklen (*Toxoplasma*-Lysat-Antigen bzw. TLA) oder mechanisch mit Hilfe der FrenchPress (*Toxoplasma*-FrenchPress-Lysat bzw. TFL) aufgeschlossen. Anschließend wurden durch Zentrifugation (10000 g, 15 min) lösliche und membrangebundene Bestandteile voneinander getrennt. Mittels ELISA wurde in den Fraktionen der GRA7-Gehalt und als Referenz der Gehalt an SAG1 bestimmt.

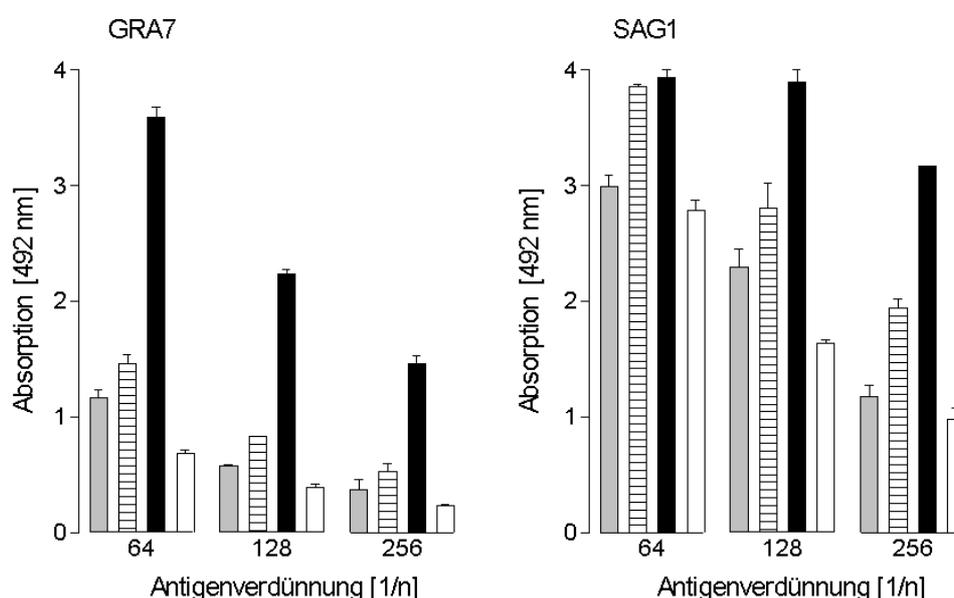


Abb. 6: Vergleich des GRA7- und SAG1-Gehaltes in TLA und TFL

Je 2.7×10^8 Toxoplasmen wurden durch Einfrier/Auftau-Zyklen (TLA; vgl. II.5.2.1) bzw. mittels FrenchPress (TFL; vgl. II.5.2.2) aufgeschlossen. Aus den Lysaten wurden Membranfragmente von den löslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (15 min, 10000 g) abgetrennt. Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden von 1:32-1:265 titriert als Antigen in einem ELISA (vgl. II.9.1.2) angelagert. Mit den mAk TxE2 und Gil wurde der Gehalt an GRA7 und SAG1 vergleichend in Überstand und Pellet beider Präparationen bestimmt.

(■ TLA_Ü, ▨ TLA_P, ■ TFL_Ü, □ TFL_P.) Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von zwei Parallelansätzen eines Versuchs. Die Kontrollwerte der Ansätze ohne Antigen bzw. ohne Primärantikörper lagen unterhalb von 0.060. Der TFL-Überstand enthielt signifikant mehr GRA7 als der TLA-Überstand ($p < 0.01$).

Der GRA7- und SAG1-Gehalt der verschiedenen Fraktionen verhielt sich gleichsinnig (Abbildung 6). Die höchsten Mengen GRA7- und SAG1 wurden im Zentrifugationsüberstand, die geringsten im Sediment nach FrenchPress-Aufschluß nachgewiesen. Der GRA7-Gehalt von Überstand und Sediment nach Einfrier/Auftau-Zyklen unterschied sich kaum, lag jedoch deutlich unter dem des Überstandes nach FrenchPress-Aufschluß. Bei der lichtmikroskopischen Kontrolle fanden sich nur im Lysat nach Einfrier/Auftau-Zyklen noch intakte

Toxoplasmen und größere Membranstücke. Das läßt einen Aufschluß der *dense granules* unwahrscheinlich erscheinen und erklärt den hohen GRA7-Gehalt des TLA-Sedimentes. Nach FrenchPress-Aufschluß waren alle Toxoplasmen vollständig zerstört, größere Membranstücke waren nicht mehr sichtbar. Der GRA7-Gehalt des TFL-Überstandes übertraf den aller anderen Fraktionen, was für ein Freisetzen des Proteins auch aus den *dense granules* spricht. Der ebenfalls hohe SAG1-Gehalt im TFL-Überstand läßt vermuten, dass die bei der Präparation entstehenden kleinsten Membranfragmente durch die Zentrifugation mit 10000 g nicht sedimentiert werden. Aufgrund der höheren GRA7-Konzentration wurde TFL für die immunoaffinitätschromatographische Reinigung von GRA7 verwendet.

2.1.2 Reinigung des Antigens

Zur immunoaffinitätschromatographischen Reinigung von GRA7 wurde der mAk TxE2 an die Hydrazid-Agarose-Matrix einer Affinitätssäule gekoppelt. Bei jedem Ansatz wurden durchschnittlich 2 mg TFL repetitiv auf die Matrix aufgetragen. Gebundenes GRA7 wurde durch pH-Verschiebung in den sauren Bereich eluiert. Zur Kontrolle der Spezifität der Reinigung wurden in einem ELISA der GRA7-, der SAG1- und der Gesamtantigengehalt der Eluate untersucht.

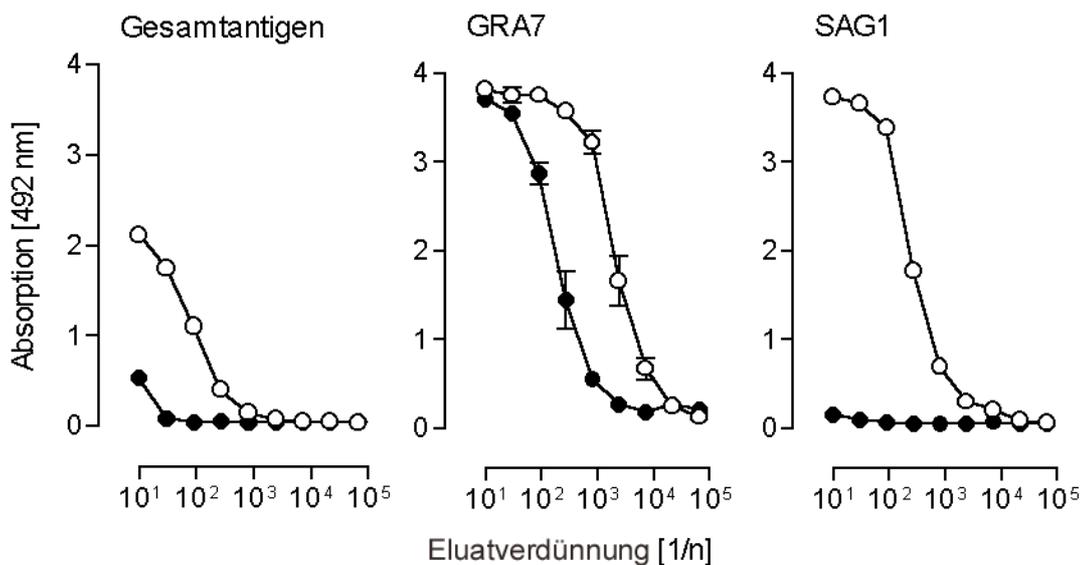


Abb. 7: Kontrolle der Spezifität der immunoaffinitätschromatographischen Reinigung von GRA7

Mittels ELISA (vgl. II.9.1.2) wurde der Antigengehalt von TFL und Säuleneluaten verglichen. Gepoolte Eluate (●) aus insgesamt sechs Säulenläufen und TFL (○) wurden von 1:10–1:65610 titriert als Antigen angelagert. Die Antigene GRA7 und SAG1 wurden über die mAk TxE2 und GII nachgewiesen. Zum Vergleich des Gesamtantigengehaltes wurde ein polyvalentes anti-*T. gondii*-Serum eingesetzt. Die Kontrollwerte der Ansätze ohne Antigen bzw. ohne Primärantikörper lagen unterhalb von 0.060. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von Doppelwerten eines Versuches.

Der GRA7-Gehalt der Eluate war hoch und lag nur geringfügig unter dem des Ausgangsmaterials (Abbildung 7). Andere *T. gondii*-Antigene, insbesondere SAG1, waren nur in sehr geringen Mengen nachweisbar, was einen erfolgreichen Reinigungsprozeß dokumentiert.

Zur Kontrolle der Elutionseffizienz wurde der GRA7-Gehalt im Verlauf des gesamten Reinigungsprozesses mittels ELISA kontrolliert. Die Abbildung 8 zeigt die GRA7-Auftrags- und Elutionsprofile dreier aufeinanderfolgender Läufe über dieselbe Säule.

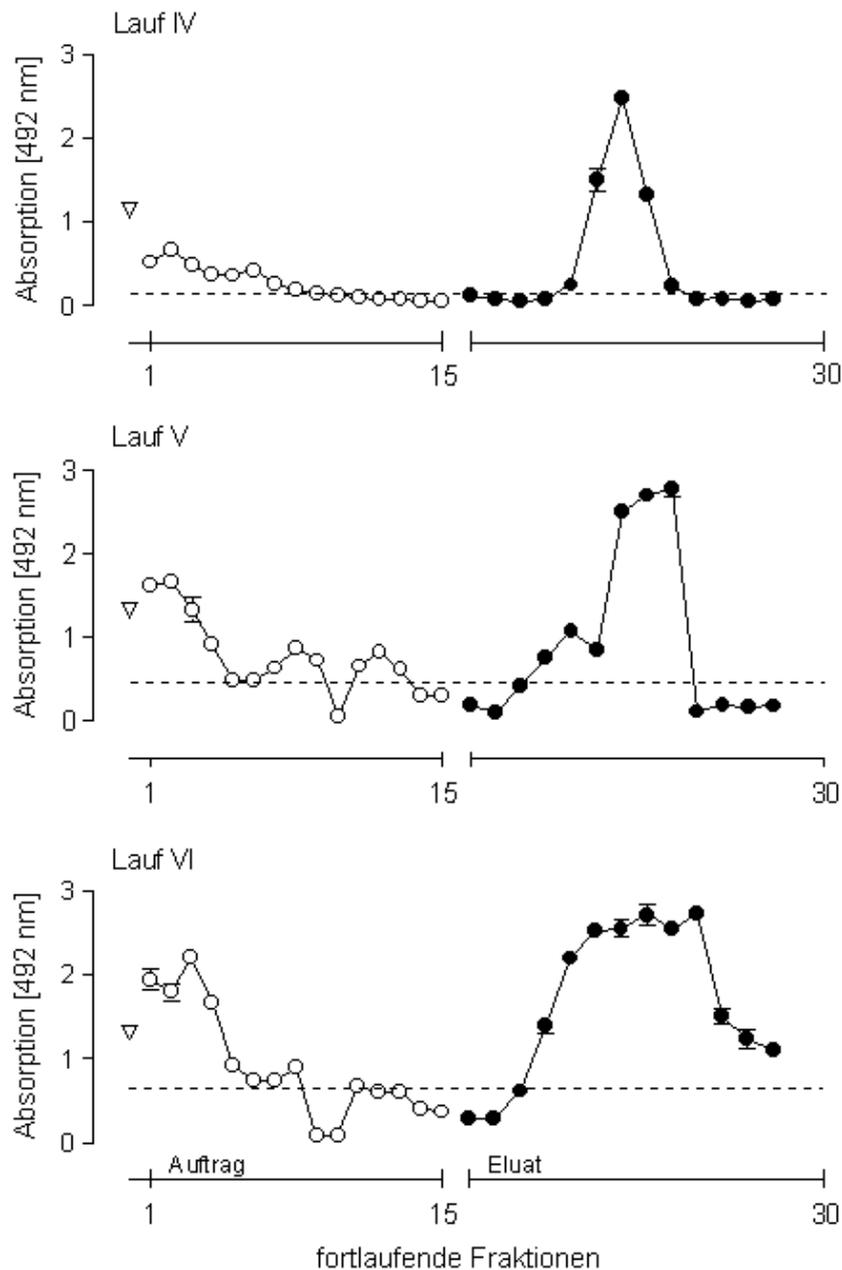


Abb. 8: Kontrolle der Elutionseffizienz

In einem ELISA wurden das TFL-Ausgangsmaterial (∇ , 1:50 verdünnt), der Säulenauftrag (\circ) mit Durchlauf (Fraktionen 1-3, 1:10 verdünnt) und Waschfraktionen (Fraktionen 4-15, unverdünnt) sowie Säulenuate (\bullet , unverdünnt) der Läufe IV, V und VI einer Säule als Antigen angelagert. GRA7 wurde in den Einzelfraktionen über den mAk TxE2 nachgewiesen. Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne Primärantikörper (---) und ein Ansatz ohne Antigen (Absorption: 0.070) mitgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von Doppelwerten eines Versuches.

In Lauf IV fanden sich drei scharf abgegrenzte Eluatfraktionen mit hohem GRA7-Gehalt. In den Durchlauf- und Waschfraktionen waren erwartungsgemäß nur sehr geringe Mengen GRA7 nachweisbar. Mit zunehmender Anzahl der Säulenläufe erhöhten sich die Meßwerte für die Negativkontrollen ohne Primärantikörper, was auf eine Ablösung des mAk TxE2 von der Säulenmatrix schließen läßt. Ein weiteres Indiz dafür war eine zunehmende Zahl von Eluatfraktionen, deren Meßwerte deutlich oberhalb der Hintergrundabsorption lagen. Eine scharfe Abgrenzung einzelner Eluatfraktionen mit hohem GRA7-Gehalt war nicht mehr möglich. Zudem konnte die Spezifität der Reinigung nicht mehr zuverlässig mittels ELISA überprüft werden, da die Sekundärantikörper nicht nur den Detektionsantikörper, sondern auch den in fast allen Fraktionen enthaltenen Fängerantikörper nachwiesen.

Aufgrund der sehr geringen Proteinkonzentration war eine Bestimmung des Proteingehaltes der einzelnen Eluate nicht möglich. Eine Proteinbestimmung von gepoolten und durch Lyophilisieren konzentrierten Eluaten aus sechs Säulenläufen ergab eine Proteinausbeute von etwa $18 \mu\text{g}/10^{10}$ Toxoplasmen. Aufgrund der erschwerten Quantifizierung, der begrenzten Regenerierbarkeit der TxE2-Affinitätsmatrix und des hohen Materialaufwandes bei geringer Ausbeute wurde GRA7 im weiteren Verlauf alternativ durch Elektroelution aus SDS-Polyacrylamidgelen angereichert.

2.2 Elektroelution von GRA7 aus SDS-Polyacrylamidgelen

TFL wurde in einer präparativen eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden zunächst durch Imidazol-SDS-Zink-Färbung dargestellt. Aus den Gelen wurde die Bande bei 29 kDa ausgeschnitten und elektroeluiert. Im Gegensatz zu Eluaten aus Coomassie-gefärbten Gelen sind Eluate aus Imidazol-SDS-Zink-gefärbten Gelen in der Zellkultur nicht toxisch und scheinen daher für die Immunisierung von Mäusen besser geeignet.

Der mittels ELISA nachgewiesene GRA7-Gehalt der Eluate aus den gefärbten Gelen war, trotz vollständiger Elution der Gelstücke, unerwartet gering. Aus diesem Grunde wurde parallel der Bereich von etwa 27–32 kDa anhand eines Proteingrößenstandards aus ungefärbten Gelen ausgeschnitten und elektroeluiert. In einem ELISA wurden der GRA7-Gehalt und der Gehalt an Gesamtantigenen der Elektroeluate aus einem gefärbten und einem ungefärbten Gel vergleichend untersucht.

In beiden Elektroeluatungen waren vergleichbare Mengen Gesamtantigenen nachweisbar (Abbildung 9). Das Eluat aus dem ungefärbten Gel enthielt jedoch deutlich mehr GRA7. Da eine Färbung des Gels mit Imidazol-SDS-Zink die Effizienz der Elution bzw. die Nachweisbarkeit von GRA7 verringert, wurde eine Kontamination der Eluate mit Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 28–32 kDa toleriert und die weitere Anreicherung des Proteins aus ungefärbten Gelen vorgenommen. Um den GRA7-Gehalt der Eluate abschätzen zu können, wurde ein Teil der Präparation erneut über eindimensionale SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel Coomassie-gefärbt (Abbildung 10) und der Proteingehalt der Bande bei 29 kDa durch Vergleich mit den Banden des Proteingrößenstandards densitometrisch ermittelt.

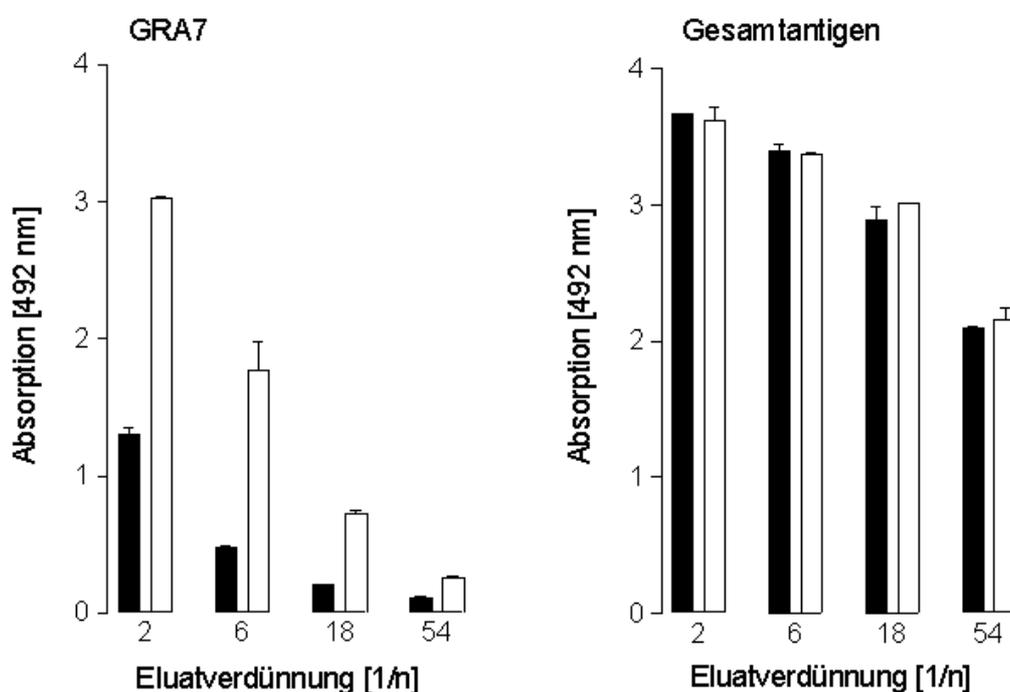


Abb. 9: Gehalt an GRA7 und Gesamtantigen in Elektroeluat aus gefärbten und ungefärbten SDS-Polyacrylamidgelen

Elektroeluate aus Imidazol-SDS-Zink-gefärbten (■) und ungefärbten (□) Gelen wurden in einem ELISA (vgl. II.9.1.2) von 1:1-1:729 titriert als Antigen angelagert. Über den GRA7-spezifischen mAk TxE2 wurde der GRA7-Gehalt beider Präparationen bestimmt. Zum Vergleich des Gesamtantigengehaltes wurde ein polyvalentes anti-*T. gondii*-Serum eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von Doppelwerten einer Analyse. Die Kontrollwerte der Ansätze ohne Antigen bzw. ohne Primärantikörper lagen unterhalb von 0.060. Eluate aus ungefärbten Gelen enthielten signifikant mehr GRA7 als Eluate aus gefärbten Gelen ($p < 0.01$).

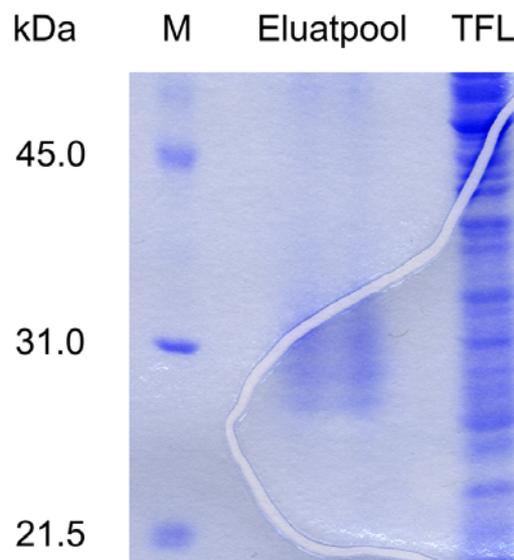


Abb. 10: Rechromatogramm der 29 kDa Elektroeluate

Lyophilisierte Elektroeluate aus insgesamt sechs Gelen wurden gepoolt. Ein Teil (1:16) der Präparation wurde erneut in zwei Spuren über SDS-PAGE (vgl. II.6.1) aufgetrennt. Zum Vergleich wurde zusätzlich TFL (40 µg/Spur) aufgetrennt. Zur Quantifizierung des Proteinanteils bei 29 kDa wurde das Gel Coomassie-gefärbt und der Proteingehalt der Bande bei 29 kDa densitometrisch, durch Vergleich mit den Banden der Markerproteine (M, 1 µg/Bande), bestimmt. Der Proteingehalt der 29 kDa Bande lag bei 0.42 µg. Insgesamt wurden 18 µg Protein mit einem p29-Anteil von etwa 7 µg eluiert.

3 Etablierung GRA7-spezifischer monoklonaler Antikörper

Die Untersuchungen zur Charakterisierung des Antigens GRA7 wurden bisher ausschließlich mit Hilfe des monoklonalen IgM Antikörpers TxE2 durchgeführt. Allgemein besitzen IgM-Antikörper durch ihre 10 Antigenbindungsstellen eine hohe Avidität (Gesamtbindungsstärke aller Bindungsstellen) zu ihrem Antigen. Die Affinität (Stärke der einzelnen Bindung) zum Epitop ist im Vergleich zu anderen Immunglobulinklassen geringer (Janeway u. Travers 1997). Diese Eigenschaften sind bei der Erkennung repetitiver Epitope in *in vivo* vorteilhaft, können aber bei Analysen *in vitro* von Nachteil sein.

Mit dem Ziel, weitere monoklonale Antikörper als Werkzeuge zur Charakterisierung von GRA7 zu etablieren, wurde eine Maus mit gereinigtem GRA7 immunisiert. Durch Fusion der Milzzellen dieses Tieres mit Myelomzellen wurden antikörperproduzierende Hybridome hergestellt.

3.1 Reaktivität der Immunsereen

Eine Maus wurde mit gereinigtem GRA7 immunisiert. Der Immunisierungserfolg wurde mittels ELISA und Western Blot-Analysen kontrolliert.

3.1.1 Antigenmuster im Western Blot

Eine Woche nach der dritten Immunisierung wies das Serum der Maus einen *T. gondii*-spezifischen Antikörpertiter von 1:3000 auf. In einer Western Blot-Analyse wurde eine Woche nach der vierten Immunisierung untersucht, ob das Immuneserum ein *Toxoplasma*-Antigen im Molekulargewichtsbereich von GRA7 erkennt. Zum Vergleich wurde ein Blotstreifen mit dem GRA7-spezifischen mAk TxE2 entwickelt.

Das Immuneserum erkennt neben einigen schwächeren Banden eine prominente Doppelbande in Höhe des TxE2-Signals. Das apparente Molekulargewicht von GRA7 liegt bei 29 kDa. Im Vergleich zu anderen Analysen erscheint das TxE2-Signal bei dieser Auftrennung jedoch bei etwa 32 kDa (Abbildung 11). Hierbei könnte es sich um die von Stachelhaus (2001) beschriebenen GRA7-Isoformen mit höherem Molekulargewicht handeln. Eine weitere Erklärung für dieses Phänomen wäre eine ungleichmäßige Auftrennung des Molekulargewichtsstandards mit Verschiebung der Markerbanden.

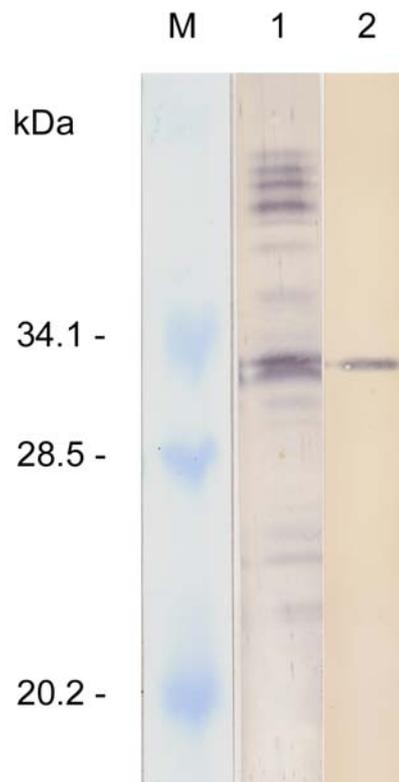


Abb. 11: Anti-*Toxoplasma*-Reaktivität des Serums der mit GRA7 immunisierten Maus

Toxoplasmen (Isolat BK) wurden über Einfrier-/Auftauzyklen aufgeschlossen. Das Gesamtlisat (20 µg/Spur) wurde in einer eindimensionalen SDS-PAGE (vgl. II.6.1) aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose geblottet (vgl. II.9.2.1). Ein Blotmembranstreifen wurde mit dem Serum der mit GRA7 immunisierten Maus (1), ein weiterer zum Vergleich mit dem GRA7-spezifischen mAk TxE2 (2) inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte über Peroxidase-gekoppelte anti-Maus-IgG/IgM-Antikörper nach enzymatischer Umsetzung des Substrates Chloronaphthol. M – Molekulargewichtsstandard.

3.1.2 Antikörpertiter gegen TLA und GRA7

Das Serum der mit GRA7 immunisierten Maus erkennt ein Protein im Molekulargewichtsbereich des durch den mAk TxE2 detektierten Antigens. Um eine GRA7-spezifische Reaktivität zu beweisen und von einer Reaktion gegenüber anderen Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht abzugrenzen, wurde in einem ELISA untersucht, ob das Immuneserum mit rekombinantem GRA7 reagiert. Das Präimmuneserum der Maus wurde zum Ausschluß einer vorbestehenden *Toxoplasma*-Infektion getestet. Als Kontrollantigen wurde TFL angelagert. Das Immuneserum wies einen anti-*T. gondii*-Titer von $1:1.3 \times 10^5$ auf. Der Titer der GRA7-spezifischen Antikörper lag bei etwa 1:100. Die Fehlende Antigenreaktivität des Präimmuneserums zeigte, dass die GRA7-spezifische Reaktivität des Immuneserums auf die Immunisierung zurückzuführen war (Abbildung 12).

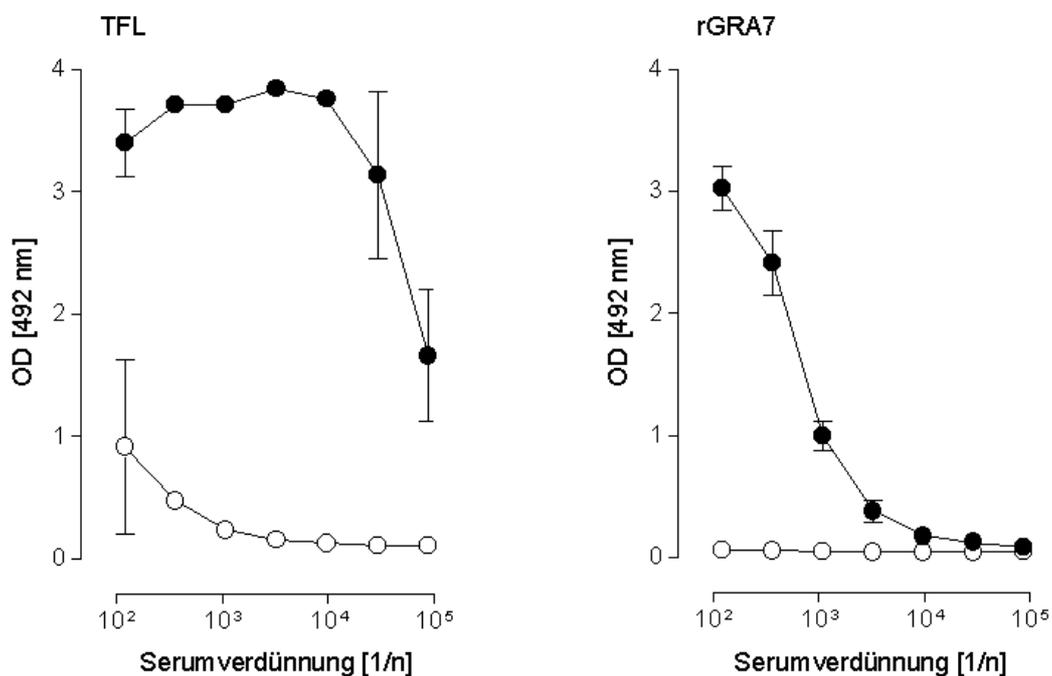


Abb. 12: *Toxoplasma*- und GRA7-spezifische Reaktivität des Immuneserums

Zum Nachweis *T. gondii*- bzw. GRA7-spezifischer Antikörper wurden das Präimmuneserum (○) und das Immuneserum (●) der mit GRA7 immunisierten Maus in einem ELISA (vgl. II.9.1.2) mit TFL (10 µg/well) und rekombinantem GRA7 (10 ng/well) als Antigen inkubiert. Die Kontrollwerte mit 1:100 verdünntem Serum ohne Antigen lagen bei 0.800. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von Doppelbestimmungen einer Analyse.

3.2 Reaktivität klonierter Hybridome

Zur Generierung antikörperproduzierender Hybridome waren die Milzzellen der mit GRA7 immunisierten Maus vier Tage nach der letzten Immunisierung mit murinen Myelomzellen fusioniert und in 96-well Zellkulturplatten ausgesät worden. Nach 1-3 Wochen Kultur unter Selektionsbedingungen wuchsen in etwa 50 % der wells Hybridome heran, deren Kulturüberstände im ELISA mit TFL als Antigen auf Anwesenheit *T. gondii*-reaktiver Antikörper untersucht wurden.

In den Überständen von 18 Hybridomkulturen konnten wiederholt TFL-reaktive Antikörper nachgewiesen werden. Diese Hybridome wurden durch limitierte Verdünnung kloniert. Aus vier dieser 18 Klonierungsansätze konnten TFL-reaktive Klone isoliert werden. In weiteren 10 Ansätzen stellten die Zellen die Antikörperproduktion ein. In den übrigen vier Ansätzen war kein Zellwachstum erkennbar.

Aus 271 Klonierungskulturen der vier erfolgreich klonierten Hybridome wurden die Überstände der niedrigsten bewachsenen Verdünnungsstufe mittels ELISA auf Anwesenheit *T. gondii*-reaktiver Antikörper untersucht. Dabei wurde TFL als Antigen und eine Milchpulverlösung als Blockreagenz eingesetzt. Neben den parasitären Antigenen enthält TFL kontaminierende Bestandteile des Mediums und der Wirtszellen der Toxoplasmen-Kultur. Um eine Kreuzreaktivität der Klone mit diesen Kontaminanten auszuschließen, wurden die TFL-reaktiven Kulturüberstände in einem weiteren ELISA mit den Kontrollantigenen FCS, Milchpulver, BSA und Wirtszell-Lysat getestet. Als weiteres Kontrollantigen wurde *E. coli*-Lysat eingesetzt, da die GRA7-spezifische Reaktivität der Kulturüberstände zu einem späteren Zeitpunkt mit rekombinantem GRA7 überprüft werden sollte. Kulturüberstände, die keine Kreuzreaktivitäten zeigten, wurden in einem Western Blot nach eindimensionaler SDS-PAGE von TFL eingesetzt. Hierbei wurden die Molekulargewichte der von den monoklonalen Antikörpern erkannten Antigene untersucht. Die Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Western Blot-Analyse einer Auswahl von 38 verschiedenen Kulturüberständen.

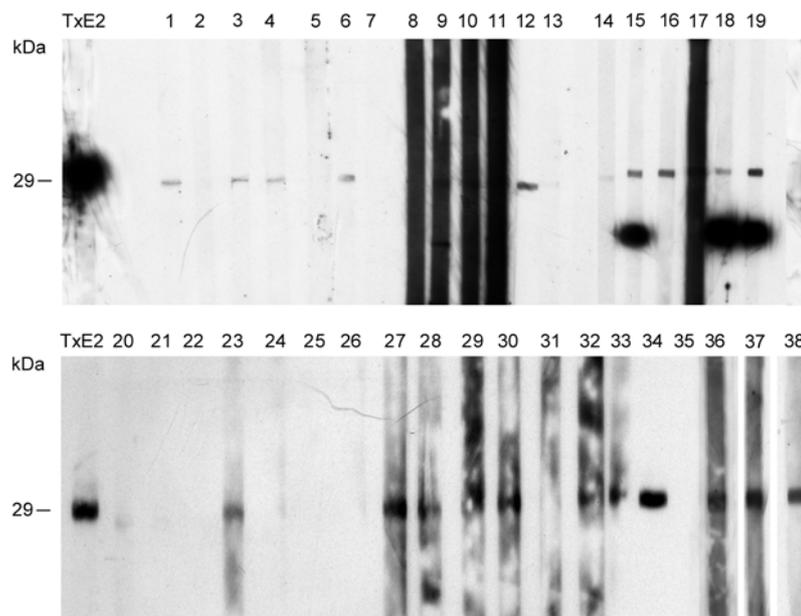


Abb. 13: Molekulargewichte der von den monoklonalen Antikörpern erkannten *Toxoplasma gondii*-Proteine

TFL (40 µg/Spur) wurde in einer eindimensionalen SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (vgl. II.6.1) und auf Nitrozellulose geblottet (vgl. II.9.2.1). Die Blotstreifen wurden mit unverdünnten Kulturüberständen der Klone inkubiert. Zum Vergleich wurde ein Blotstreifen mit dem GRA7-spezifischen mAk TxE2 inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-IgG/IgM-Antikörper über den Umsatz des Substrates Luminol detektiert.

Von 38 Kulturüberständen erkannten die Überstände 1, 3, 4, 6, 12, 14, 23 und 27 ein Antigen in Höhe des TxE2-Signals. Die Überstände 15, 18 und 19 erkannten jeweils eine Bande oberhalb des TxE2-Signals bei etwa 30 kDa und unterhalb von 20 kDa. Der Überstand 28 erkannte eine Bande in Höhe des TxE2-Signals und eine weitere unterhalb von 20 kDa. Die Erkennung mehrerer Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht kann auf das Vorhandensein von Antigenabbauprodukten zurückzuführen sein. Andererseits könnte es sich hierbei auch um Überstände von nicht monoklonalen Klonierungskulturen handeln. Die Überstände 16, 30, 34, 36, 37 und 38 erkannten eine einzelne Bande bei 30 kDa. Bei den Überständen 8, 9, 10, 11 und 17 zeigten sich lediglich starke unspezifische Reaktionen in Form hoher Hintergrundsignale. Alle übrigen Überstände reagierten nicht.

Insgesamt wurden acht Hybridome kloniert, deren Überstände ein Antigen von etwa 29 kDa erkannten, acht weitere produzierten Antikörper gegen ein 30 kDa Antigen, wobei drei zusätzlich ein Antigen unterhalb von 20 kDa erkannten. Klone, deren Kulturüberstände ein Antigen erkannten, wurden kryokonserviert und zur Analyse der Antigenpezifität einige Wochen später wieder aufgetaut und kultiviert. Die Kulturüberstände wurden in einem ELISA bezüglich ihres Gehaltes an *T. gondii*- und GRA7-spezifischen Antikörpern getestet. Alle Klone hatten nach dem Auftauprozeß die Antikörperproduktion eingestellt.

4 Charakterisierung der GRA7-spezifischen Antikörper TxE2, BATO214 und 5-241-178

Antigen-spezifische monoklonale Antikörper sind Werkzeuge zur Analyse von Struktur, Lokalisation und immunogener Bedeutung eines Antigens. Im Verlaufe dieser Arbeit wurden die GRA7-spezifischen mAk TxE2 (Fischer *et al.* 1998), BATO214 (Jacobs *et al.* 1998) und 5-241-178 (Bonhomme *et al.* 1998) bezüglich ihrer Immunglobulinklassen und ihrer Reaktivität gegenüber rekombinantem GRA7 analysiert. Durch Epitopkartierung wurde die Lage der Antigenbindungsstellen auf der GRA7-Proteinsequenz ermittelt. Ansonsten wurden reaktive Proteinspots im zweidimensional aufgetrennten *Toxoplasma*-Lysat durch Western Blot-Analysen bestimmt.

4.1 Isotypen und Reaktivität gegenüber rekombinantem GRA7

Immunglobuline besitzen jeweils zwei identische leichte und schwere Ketten. Die Immunglobulinklassen werden durch die konstanten Regionen der schweren Ketten definiert. In der Maus werden acht verschiedene Isotypen der schweren Ketten unterschieden, die den Antikörpern unterschiedliche funktionelle Eigenschaften verleihen. Die spezifische Antigenbindungs-fähigkeit (Affinität), die Gesamtantigenbindungsstärke (Avidität) und die Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Komponenten des Immunsystems werden maßgeblich durch die Immunglobulinklasse der Antikörper bestimmt (Janeway u. Travers 1997). Zur Einschätzung der Eigenschaften monoklonaler Antikörper ist daher die Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen von Bedeutung.

In einem Sandwich-ELISA wurden die Isotypen der mAk TxE2, BATO214 und 5-241-178 ermittelt. Der mAk TxE2 gehört zu der Immunglobulinklasse IgM, die bevorzugt in der Frühphase der Immunantwort gebildet wird. Diese Antikörper besitzen durch ihre 10 Antigenbindungsstellen eine hohe Avidität, ihre Antigenaffinität ist jedoch geringer als bei den anderen Immunglobulinklassen (Janeway u. Travers 1997). Bei den mAk BATO214 und 5-241-178 handelt es sich um IgG-Antikörper des Subtyps 2a (Tabelle 2). Die Bildung von IgG 2a wird durch das auch bei der Immunabwehr gegen *T. gondii* dominierende T_H1-

Zytokin IFN- γ induziert. Diese Antikörper sind hochspezifisch und besitzen eine hohe Affinität zu ihrem Antigen, ihre effektive Avidität ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl von nur zwei Antigenbindungsstellen begrenzt. Alle untersuchten mAk besitzen leichte Ketten des *in vivo* vorherrschenden κ -Typs.

Die Reaktivität der monoklonalen Antikörper TxE2, BATO214 und 5-241-178 gegenüber rekombinatem GRA7 wurde in einem ELISA untersucht (Tabelle 2). Der mAk TxE2 reagiert nicht, die mAk BATO214 und 5-241-178 hingegen reagieren deutlich mit dem rekombinant hergestellten Protein. Als Ursachen für die fehlende Erkennung des rekombinanten Antigens durch den mAk TxE2 ist z.B. eine im Vergleich zum nativen Protein veränderte Sekundärstruktur des rekombinanten GRA7 denkbar.

mAk	Isotyp	TLA	*rGRA7
TxE2	IgM κ	+	-
BATO214	IgG2a κ	+	+
5-241-178	IgG2a κ	+	+

* r = rekombinantes GRA7

Tab. 2: GRA7-spezifische monoklonale Antikörper: Isotypen und Reaktivität gegenüber TLA und rekombinatem GRA7

Die Isotypen der GRA7-spezifischen mAk TxE2, BATO214 und 5-241-178 wurden in einem ELISA mit isotypspezifischen Antikörpern bestimmt. In einem ELISA mit rekombinatem GRA7 und TLA als Kontrollantigen wurde die Reaktivität gegenüber rekombinatem GRA7 untersucht. Als fehlende Reaktivität wurden Werte von weniger als der zweifachen Hintergrundabsorption der Kontrollen ohne Antigen bzw. ohne Antikörper definiert.

4.2 Epitopsequenzen

In unserer Arbeitsgruppe wurden die Arbeiten zu GRA7 mit dem mAk TxE2 durchgeführt. Die von anderen Arbeitsgruppen zu GRA7 veröffentlichten Arbeiten wurden mit den mAk BATO214 (Jacobs *et al.* 1998) und 5-241-178 (Bonhomme *et al.* 1998) durchgeführt. Die Kenntnis der Lage spezifischer Antikörperbindungsstellen ermöglicht differenzierte Untersuchungen zur Identifikation immunogener Proteinbereiche, zur Membrantopologie oder zu Transport, Modifikation und Funktion eines Proteins.

Die Proteinsequenz von GRA7 umfaßt 236 Aminosäuren. Sie ist insgesamt zu 27.5 % identisch mit der des *dense granule* Proteins NCDG1 von *Neospora caninum*, einem *T. gondii* eng verwandten tierpathogenen Sporozoon. Die GRA7-Sequenz enthält zwei hydrophobe Domänen, von denen die eine Teil einer putativen N-terminalen Signalsequenz ist, und die andere Merkmale einer Transmembrandomäne trägt.

Um die Position der Bindungsstellen der mAk TxE2, BATO214 und 5-241-178 innerhalb der GRA7-Primärstruktur zu bestimmen, wurde ein *epitope mapping* durchgeführt. Dazu wurden 76 an eine Nitrozellulose-Membran gebundene Peptide verwendet. Die Peptide hatten eine Länge von 13 Aminosäuren und deckten, bei einer N- bzw. C-terminalen Überlappung von jeweils drei Aminosäuren, die gesamte GRA7-Sequenz ab (Abbildung 14).

Die membrangekoppelten Peptide wurden mit den zu charakterisierenden mAk inkubiert. Gebundene Antikörper wurden auf PVDF-Membranen geblottet und über einen Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper immunchemisch nachgewiesen. Auf diese Weise konnte jedem mAk ein Epitop mit einer bestimmten Aminosäuresequenz zugeordnet werden.

```

1 MARHAIFSALCVLGLVAAAALPQFATAATASDDELMSRIRNSDFFDGOAPVDSL RPTNAGVDSKGTDDHLT
2 HAIFSALCVLGLV
3 FSALCVLGLVAAA
4 LCVLGLVAAAALPQ
5 LGLVAAAALPQFAT
6 VAAAALPQFATAAT
7 ALPQFATAATASD
8 QFATAATASDDEL
9 TAATASDDELMSR
10 TASDDELMSRIRN
11 DDELMSRIRNSDF
12 LMSRIRNSDFFDG
13 RIRNSDFFDGOAP
14 NSDFFDGOAPVDS
15 FFDGOAPVDSL R P
16 GOAPVDSL R P T N A
17 PVDSL R P T N A G V D
18 SL R P T N A G V D S K G
19 P T N A G V D S K G T D D
20 A G V D S K G T D D H L T

21 DSKGTDDHLTTSMDKASVESQLPRREPLETEPDEQEEVHFRKRGVRSDAEVTDDNIYEEHTDRKVVPRKS
22 GTDDHLTTSMDKA
23 DHLTTSMDKASVE
24 TTSMDKASVESQL
25 MDKASVESQLPRR
26 ASVESQLPRREPL
27 ESQLPRREPLETE
28 LPRREPLETEPDE
29 REPLETEPDEQEE
30 LETEPDEQEEVHF
31 EPDEQEEVHFRKR
32 EQEEVHFRKRGVR
33 EVHFRKRGVRSDA
34 FRKRGVRSDAEVT
35 RGVRSDAEVTDDN
36 RSDAEVTDDNIYE
37 AEVTDDNIYEEHT
38 TDDNIYEEHTDRK
39 NIYEEHTDRKVV P
40 EEHTDRKVVPRKS

41 TDRKVVPRKSEGKRSFKDLLKKLALPAVGMGASYFAADRLVPELTEEQQRGDEPLTTGQNVGTVLGF AAL
42 KVVPRKSEGKRSE
43 PRKSEGKRSFKDL
44 SEGKRSFKDLLKK
45 KRSFKDLLKKLAL
46 FKDLLKKLALPAV
47 LLKKLALPAVGMG
48 KLALPAVGMGASY
49 LPAVGMGASYFAA
50 VGMGASYFAADRL
51 GASYFAADRLVPE
52 YFAADRLVPEL T E E
53 ADRLVPEL T E E Q Q
54 LVPEL T E E Q Q R G D
55 EL T E E Q Q R G D E P L
56 E E Q Q R G D E P L T T G
57 Q R G D E P L T T G Q N V
58 D E P L T T G Q N V G T V
59 L T T G Q N V G T V L G F
60 Q N V G T V L G F A A L

61 VGTVLGF A A L A A A A A F L G M G L T R T Y R H F S P R K N R S R Q P A L E Q E V P E S G E D G E D A D A R Q
62 VLGF A A L A A A A A F
63 FA A L A A A A A F L G M
64 L A A A A A F L G M G L T
65 A A A F L G M G L T R T Y
66 F L G M G L T R T Y R H F
67 M G L T R T Y R H F S P R
68 T R T Y R H F S P R K N R
69 Y R H F S P R K N R S R Q
70 F S P R K N R S R Q P A L
71 R K N R S R Q P A L E Q E
72 R S R Q P A L E Q E V P E
73 Q P A L E Q E V P E S G E
74 L E Q E V P E S G E D G E
75 Q E V P E S G E D G E D A D
76 V P E S G E D G E D A R Q

```

Abb. 14: Überlappende GRA7-Peptide

Zur Kartierung von Epitopen auf der GRA7-Sequenz (vgl. II.9.3) wurden 76 an eine Nitrozellulose-Membran gebundene Peptide verwendet. Die Peptide hatten eine Länge von 13 Aminosäuren und deckten, bei einer N- bzw. C-terminalen Überlappung von jeweils drei Aminosäuren, die gesamte 236 Aminosäuren umfassende GRA7-Sequenz ab.

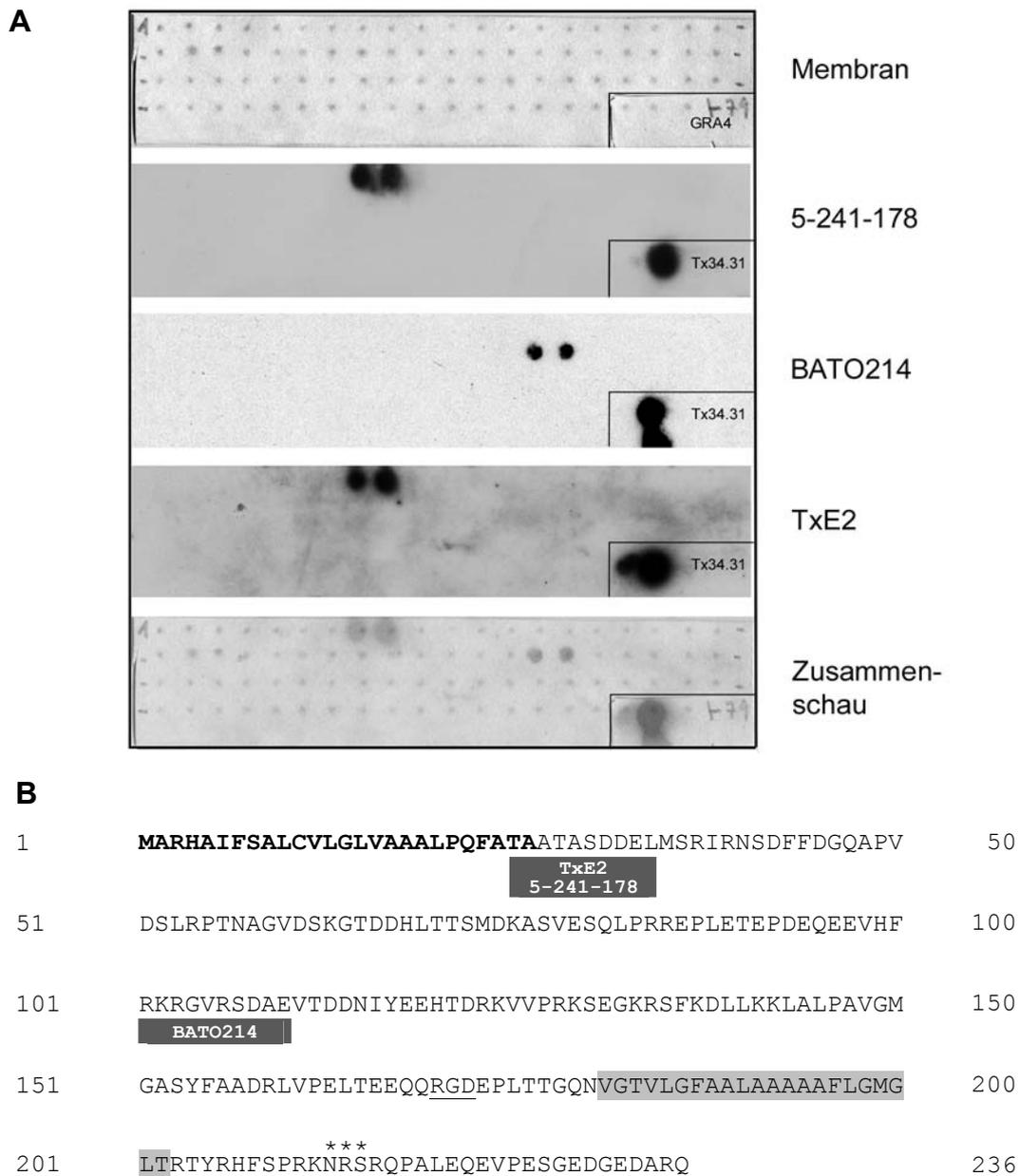


Abb. 15: Epitopsequenzen GRA7-spezifischer monoklonaler Antikörper

Die 76 membrangebundenen GRA7-Peptide wurden mit den mAk 5-241-178, BATO214 bzw. TxE2 inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Peptid mit der Epitopsequenz des anti-GRA4-Antikörpers Tx34.31 (78) und zwei flankierende, nicht epitoptragende Peptide (77, 79) mit dem mAk Tx34.31 (Meisel *et al.* 1998) inkubiert. Gebundene mAk wurden auf PVDF-Membranen gebロットet und mittels Immundetektion nachgewiesen. Abbildung A zeigt die Anordnung der insgesamt 79 Peptide auf der Membran, die von den mAk erkannten Peptide, sowie eine computergenerierte Zusammenschau aller Kartierungsergebnisse. Abbildung B zeigt die Lage der Epitope in der GRA7 Proteinsequenz und ihre Position zu den charakteristischen Bereichen (Stachelhaus 2001). Die N-terminale Signalsequenz ist fettgedruckt, die Transmembrandomäne ist hellgrau unterlegt. Die Balken unterhalb der Sequenz markieren die Lage der Epitope. Das RGD-Motiv ist unterstrichen, die potentielle N-Glykosylierungsstelle mit Sternen markiert.

Die mAk TxE2 und 5-241-178 reagieren beide ausschließlich mit den Peptiden Nr. 8 und Nr. 9. Auf der GRA7-Primärstruktur umfaßt dieses Epitop die Aminosäuren 25–34 in direkter Nachbarschaft zur potentiellen Signalsequenz. Der mAk BATO214 reagiert ausschließlich mit den Peptiden Nr. 34 und Nr. 35. Dieses Epitop umfasst die Aminosäuren 101-110 und befindet sich etwa mittig zwischen Signalsequenz und Transmembrandomäne (Abbildung 15). Im Rahmen einer in unserer Arbeitsgruppe vorausgegangenen Kartierung war das TxE2-Epitop in der Region der Aminosäuren 20-60 lokalisiert worden (Stachelhaus 2001). Die Ursache für die abweichende Ausdehnung des Epitops könnte in dem größeren Peptidraster von 46 Peptiden mit je 15 Aminosäuren und einer Überlappung von jeweils fünf Aminosäuren liegen.

Zwei von drei untersuchten mAk binden ein Epitop in direkter Nachbarschaft des Signalpeptids. Der dritte mAk erkennt ein Epitop etwa mittig zwischen den beiden hydrophoben Bereichen von Signalpeptid und Transmembrandomäne. Alle drei Epitope sind N-terminal zur möglichen Transmembrandomäne lokalisiert. Screening-Analysen von Seren akut und chronisch *T. gondii*-infizierter Patienten zeigen, dass ein hoher Anteil der Seren den GRA7-Sequenzbereich der Aminosäuren 97-146 erkennt (Jacobs *et al.* 1998). Zusammengenommen geben diese Ergebnisse Hinweise auf eine besondere immunogene Bedeutung des Sequenzbereiches N-terminal zur Transmembrandomäne.

4.3 Nachweis GRA7-Epitop-tragender Proteine im zweidimensional aufgetrennten *Toxoplasma*-Lysat

Obwohl die mAk TxE2 und 5-241-178 in einem *epitope mapping* identische Peptide binden, reagiert TxE2 im Gegensatz zu 5-241-178 nicht mit rekombinantem GRA7 (vgl. III.4.1). Da TxE2 an ein Partialpeptid bindet, kann das Fehlen eines diskontinuierlichen Epitops als Ursache für das Nicht-Erkennen des rekombinanten Antigens ausgeschlossen werden. Zur Identifizierung von GRA7-Protein-Spots und zur Aufdeckung möglicher Unterschiede bei der Antigenerkennung wurde TLA in einer zweidimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie-gefärbt und auf Nitrozellulose-Membranen geblottet. Auf den Membranen wurde GRA7 mit den drei GRA7-spezifischen mAk TxE2, 5-241-178 und BATO214 nachgewiesen (Abbildung 16). Da die Proteinfärbung auf der Membran erhalten bleibt, können die Signale des immunchemischen Antigennachweises den Protein-Spots genau zugeordnet werden.

Alle drei mAk erkennen drei GRA7-Hauptspots innerhalb des Molekulargewichtsbereiches von 29-25 kDa und *pI* 3.8-4.8: Der Abgleich mit einem zweidimensionalen Proteinstandard ergibt für den dominanten Spot bei 29 kDa einen *pI* von 4.8. Ein zweiter 29 kDa Spot liegt in einem saureren Bereich bei einem *pI* von etwa 4.2 und ist in Coomassie-gefärbten Gelen nicht sichtbar. Der dritte Spot liegt bei 25 kDa und *pI* 4.6. Bei der Immunfärbung mit jedem der drei mAk wird das Signal bei 29 kDa und *pI* 4.8 betont. In Abhängigkeit von der Antigenpräparation wurden durch die mAk 5-241-178 und BATO214 weitere Spots in einem Bereich von etwa 20-34 kDa und *pI*-3.8-5.1 detektiert. Diese Nebenspot konnten allerdings nicht in allen mit diesen Antikörpern durchgeführten Western Blot-Analysen reproduziert werden. Es könnte sich hierbei um Abbauprodukte von GRA7 handeln.

Zur Kontrolle der GRA7-Identität der Spots wurden aus zweidimensionalen Coomassie-gefärbten Proteingelen einzelne, im Western Blot reaktive Spots ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) bezüglich ihrer Homologie zur GRA7-Aminosäuresequenz überprüft. Alle drei Hauptspots zeigen eindeutige Homologien zur GRA7-Sequenz.

Im Falle des dominanten Spots bei 29 kDa und *pI* 4.8 decken die identifizierten Peptide bis zu 64 % der GRA7-Primärstruktur ab. Die GRA7-homologen Bereiche sind über die gesamte Proteinsequenz verteilt und befinden sich hier im Bereich der Aminosäuren 38-103, 107-123, 135-170 und 204-236. Da der das Signal bei 29 kDa und *pI* 4.2 repräsentierende Protein-Spot in Coomassie-gefärbten Gelen nicht sichtbar ist, wurde an benachbarten Protein-Spots orientiert ein Gelstück ausgeschnitten, das der Position des Signals im Western Blot entsprach. Die in diesem Gelstück identifizierten Peptide decken 31.4 % der GRA7-Sequenz im Bereich der Aminosäuren 40-63, 85-101, 160-170 und 115-236 ab. Die Peptide aus dem in Coomassie-gefärbten Gelen nicht eindeutig abgrenzbaren Protein-Spot bei 25 kDa und *pI* 4.6 zeigten Übereinstimmungen von insgesamt 20.3 % und deckten die Aminosäuren 125-141, 160-170 und 217-236 im mittleren und C-terminalen Bereich des Proteins ab. Auch in den Nebenspots mit geringerem Molekulargewicht als die Hauptspots ließen sich Partialhomologien zur GRA7-Sequenz mit bis zu 20 % Abdeckung nachweisen. Hierbei könnte es sich um Abbauprodukte von GRA7 handeln. Die Übereinstimmung der Reaktivitätsmuster der drei mAk mit den deutlichen Unterschieden der Signalstärke im Bereich der drei Hauptspots wird durch das Ergebnis der MALDI-MS-Analyse gestützt.

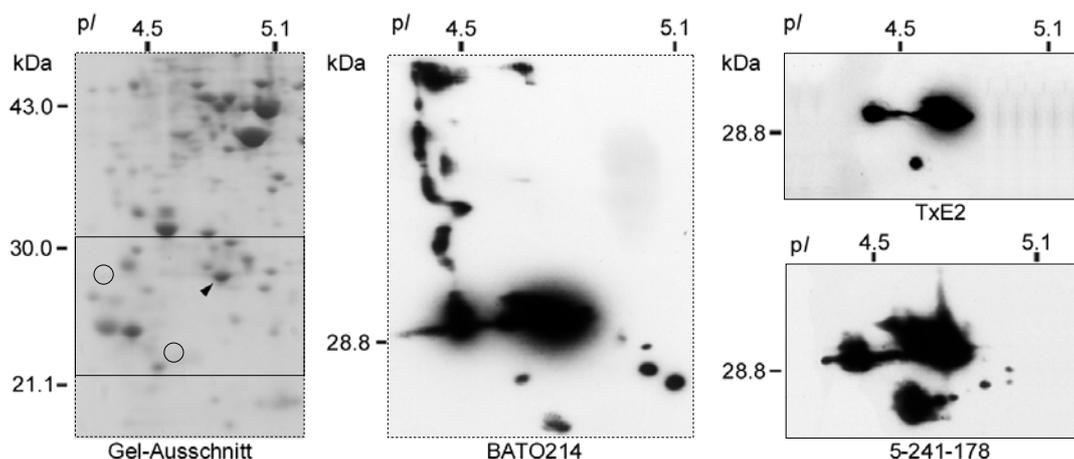


Abb. 16: Positionen epitoptragender GRA7-Proteinsequenzen nach zweidimensionaler Auftrennung von TLA

TLA (2 mg) wurde in der ersten Dimension in einem nicht linearen Gradienten von pH 3-10 entsprechend der Ladung von sauer nach basisch aufgetrennt (vgl. II.6.2). In der zweiten Dimension wurden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes (kDa) getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele Coomassie-gefärbt und die gefärbten Proteine anschließend auf Nitrozellulose-Membranen geblottet. Auf den Blotmembranen wurde GRA7 durch Immunfärbung mit den mAk TxE2, 5-241-178 und BATO214 nachgewiesen (vgl. II.9.2.2). Die Pfeilspitze markiert die Position des dominanten GRA7-Spots bei 29 kDa, *pI* 4.8, die Kreisfiguren markieren die Lage der in Coomassie gefärbten Gelen nicht sichtbaren Spots bei 29 kDa, *pI* 4.2 und 25 kDa, *pI* 4.6.

5 Attenuierung virulenter Toxoplasmen des Isolates BK durch Passage in Zellkulturen

Versuche im Mausmodell zeigten, dass der Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* entscheidend von der Virulenz des Erregers abhängt. Virulenzunterschiede zwischen verschiedenen

Isolaten in der akuten Phase der Infektion, die mit dem Auftreten bestimmter Isoenzymmuster, genetischer und antigenetischer Marker korrelieren, führten zu einer Einteilung der Spezies *T. gondii* in drei Untergruppen (Howe *et al.* 1996, Meisel *et al.* 1996, Howe u. Sibley 1995). Eine Infektion mit hochvirulenten Subtyp I Toxoplasmen führt bei allen Mausstämmen in der Regel auch bei einer geringen Erregerdosis (< 10 Parasiten) in der akuten Phase der Infektion innerhalb von 2-3 Wochen zum Tode. Eine Infektion mit Isolaten der relativ avirulenten Subtypen II und III führt, selbst bei einer hohen Erregerdosis ($> 10^3$ Parasiten), zu einer chronischen Infektion mit Ausbildung von Gewebezysten. Bei *T. gondii*-suszeptiblen Mäusen entwickelt sich eine chronisch-progressive, letale Enzephalitis (Suzuki *et al.* 1989).

Obwohl die virulenten Subtyp I und die avirulenten Subtyp II und Subtyp III Stämme nahezu identische Genotypen besitzen, sind die Genkombinationen, die zur Ausprägung eines virulenten Phänotyps führen ebenso wie die molekulare Basis der Virulenz nahezu ungeklärt (Sibley *et al.* 1999). Für das *dense granule* Protein GRA2 und das Oberflächenantigen SAG3 konnte ein Beitrag zur Virulenz in der akuten Phase der Infektion nachgewiesen werden. Eine Infektion mit GRA2- bzw. SAG3-defizienten Subtyp I Toxoplasmen führte in Mäusen zu einer im Vergleich zum Wildtyp deutlich verminderten Mortalität und zu einer persistierenden Infektion (Mercier *et al.* 1998, Dzierszinski *et al.* 2000).

Mausvirulente Subtyp I Parasiten attenuieren durch Passage in immunisierten Mäusen oder durch mutagenen Streß (Yano u. Nakabayashi 1986, Yap *et al.* 1998). *Theileria annulata*, ein den Toxoplasmen verwandtes tierpathogenes Protozoon, attenuiert durch wiederholte Passage in Zellkulturen (Darghout *et al.* 1996). Dieser Verlust an Virulenz kann Folge einer veränderten Genexpression sein oder auch durch eine Fluktuation innerhalb der Parasitenpopulation verursacht werden. Ein direkter Vergleich attenuierter Parasiten mit dem zu Grunde liegenden Wildtyp könnte die Virulenzmechanismen der aufklären.

Um die Bedeutung von GRA7 für die Virulenz von *T. gondii* zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Toxoplasmen des Isolates BK (Subtyp I) durch dauerhafte Passage in Zellkulturen attenuiert. Mit dem virulenten Wildtyp als Referenz wurde zunächst die Virulenz und das Zellkulturverhalten des attenuierten Phänotyps untersucht. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden die Expression von GRA7 und weiterer *dense granule* Proteine, sowie Reaktivitätsmuster der GRA7-spezifischen mAk TxE2, BATO214 und 5-241-178 vergleichend analysiert.

5.1 Akute Virulenz in Mäusen

In Kooperation mit Frau Prof. Dr. H. Dlugonska (Institut für Mikrobiologie und Immunologie der Universität Lodz, PL) wurde der Effekt einer kontinuierlichen Zellkulturpassage auf die Virulenz von Toxoplasmen des mausvirulenten Isolates BK durch Infektion von Mäusen untersucht. Dazu wurden zunächst Gruppen von sechs naiven BALB/c Mäusen mit 10 , 10^3 oder 10^4 Parasiten aus der Zellkultur (aBK) oder aus dauerhafter *in vivo*-Passage (vBK) intraperitoneal infiziert und der Zeitpunkt des Todes nach Infektion aufgezeichnet. Mäuse, die mit *in vivo* passagierten Parasiten infiziert waren, zeigten bereits 5-6 Tage p.i. Symptome einer Infektion wie glanzloses rauhes Fell, Schreckhaftigkeit, Tremor und Gangunsicherheit. Nach Infektion mit mit zehn Tachyzoiten starben alle Mäuse, die mit Tachyzoiten aus *in vivo*-Passage infiziert waren am neunten Tag, während alle Mäuse, die mit Parasiten aus der Zellkultur infiziert waren überlebten (Abbildung 17).

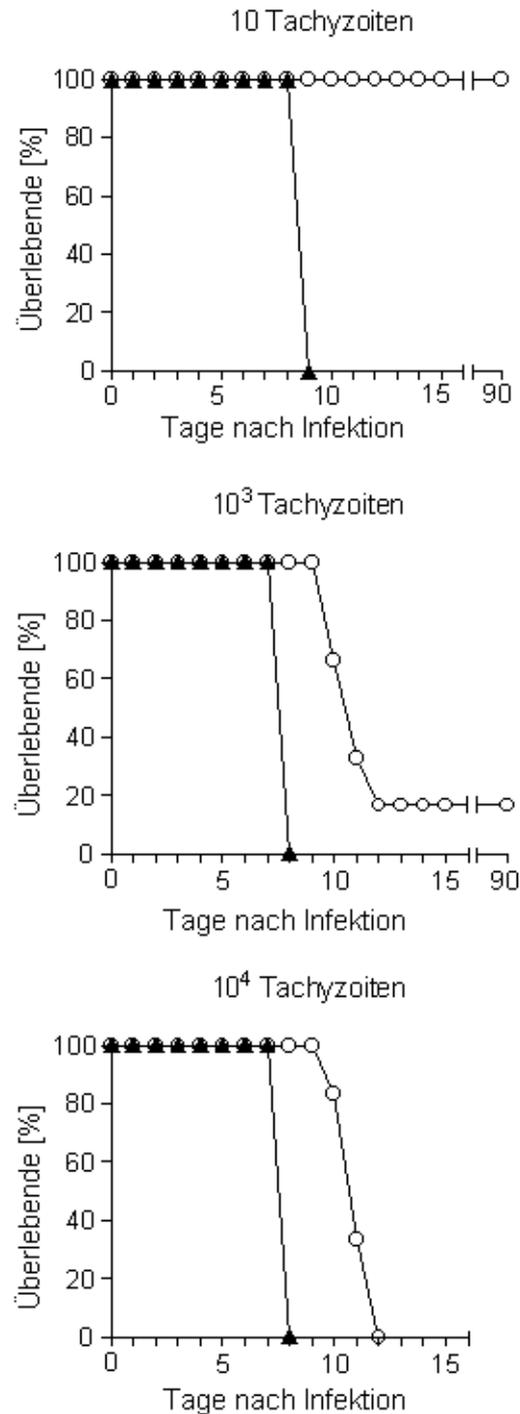


Abb. 17: Letalität von Mäusen nach Infektion mit *in vivo* oder *in vitro* passagierten Toxoplasmen

Gruppen von sechs BALB/c Mäusen gleichen Alters und Geschlechts wurden intraperitoneal mit Tachyzoiten des Isolats BK infiziert, die zuvor kontinuierlich in Mäusen (vBK, ▲) oder in der Zellkultur (aBK, ○) passagiert wurden. Der Verlauf der Infektion mit 10, 10³ oder 10⁴ Toxoplasmen wurde über einen Zeitraum von 90 Tagen beobachtet. Dargestellt ist der Prozentanteil der überlebenden Tiere in Bezug zur Dauer der Infektion. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zwei weiteren Experimenten mit BALB/c Mäusen erzielt.

Eine Steigerung der Infektionsdosis dieser attenuierten Parasiten auf 10^3 Parasiten/Maus erhöhte die Letalität auf 83 %. Nach Infektion mit 10^4 Parasiten/Maus betrug die Letalität 100 %. Die sicher letale Infektionsdosis war im Vergleich zu den vBK Parasiten somit 1000fach höher. Der Verlust an Virulenz durch Attenuierung in der Zellkultur zeigte sich auch im Vergleich der Überlebenszeiten. Während alle mit 10^4 vBK Parasiten infizierten Mäuse sieben Tage überlebten, überlebten die Mäuse, die mit der gleichen Dosis aBK Parasiten infiziert worden waren, durchschnittlich 11 Tage ($P = 0.0016$).

Eine Inokulation von weniger als 10^4 abgetöteten Tachyzoiten des *T. gondii*-Isolates RH (Gruppe I) bewirkt bei Mäusen keine Serokonversion, eine Infektion mit weniger als 10 lebenden Tachyzoiten führt hingegen zur Bildung *T. gondii*-spezifischer Antikörper (Mercier *et al.* 1998). Zum Nachweis der tatsächlichen *Toxoplasma*-Infektion wurde der Titer der *T. gondii*-spezifischen Antikörper im Serum der überlebenden Mäuse mittels ELISA überprüft. Alle überlebenden Tiere wiesen einen *T. gondii*-spezifischen Antikörpertiter von mehr als 1:100 auf, was eine tatsächliche Infektion der Mäuse beweist. In den Gehirnen überlebender Tiere waren drei Monate p.i. keine Zysten nachweisbar (Nischik *et al.* 2001), was für eine Eliminierung der Parasiten durch die Immunabwehr des Wirtes sprechen könnte. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, dass auch bei *T. gondii* eine dauerhafte Passage in Zellkulturen zu einer Attenuierung virulenter Phänotypen führt.

5.2 Infektion von Wirtszellen

Um Hinweise auf die Ursache der unterschiedlichen Virulenz der Phänotypen zu erhalten, wurden attenuierte (aBK) und virulente (vBK) Toxoplasmen zunächst in der Zellkultur bezüglich der Parameter Proliferation, Stoffwechselaktivität und Infektiosität verglichen.

5.2.1 Proliferation und Stoffwechselaktivität

Als ein möglicher Parameter der Virulenz von *T. gondii* wurde die Geschwindigkeit der intrazellulären Proliferation gemessen. Wird einer Toxoplasmenkultur ^3H -Uracil zugesetzt, so wird die Base selektiv in die parasitäre RNA und DNA eingebaut (Pfefferkorn 1977). Der Einbau von ^3H -Uracil ist somit eine Meßgröße sowohl für die Proliferation, als auch für die Stoffwechselaktivität der Parasiten.

In einem Toxoplasmen-Proliferationstest wurden L929-Fibroblastenkulturen mit 0.003-10 attenuierten (aBK) oder virulenten (vBK) Parasiten/Wirtszelle infiziert. Die Testkulturen wurden 2, 24 bzw. 48 h nach Infektion mit ^3H -Uracil pulsmarkiert, und der Einbau der radioaktiv markierten Base wurde nach weiteren 18 h gemessen. Parallel dazu wurden die Ansätze mikroskopisch untersucht. Überraschenderweise proliferierten aBK Tachyzoiten schneller als vBK Tachyzoiten (Abbildung 18). In den Testkulturen, die 24 h p.i. pulsmarkiert worden waren, zeigte sich bereits bei einem Infektionsverhältnis von 0.1 Parasiten/Wirtszelle ein deutlicher ^3H -Uracil-Einbau, eine vergleichbare Proliferation der vBK Parasiten war erst bei einem Infektionsverhältnis von 1 Parasit/Wirtszelle meßbar. Bei Testkulturen, die 24 h später mit ^3H -Uracil markiert worden waren, zeigte sich bereits bei geringeren Infektionsdosen eine Proliferation auf vergleichbarem Niveau. Insgesamt war jedoch die bei aBK Parasiten gemessene maximale ^3H -Uracil-Inkorporation geringer als die der vBK Parasiten.

Bei einem Infektionsverhältnis von 10 Toxoplasmen/Wirtszelle waren in der mit aBK Parasiten infizierten Testkultur bereits 24 h p.i. mikroskopisch nur noch vereinzelt Wirtszellen nachweisbar. In der mit vBK Parasiten infizierten Parallelkultur waren zum gleichen Zeitpunkt noch etwa 30 % der Wirtszellen nicht lysiert.

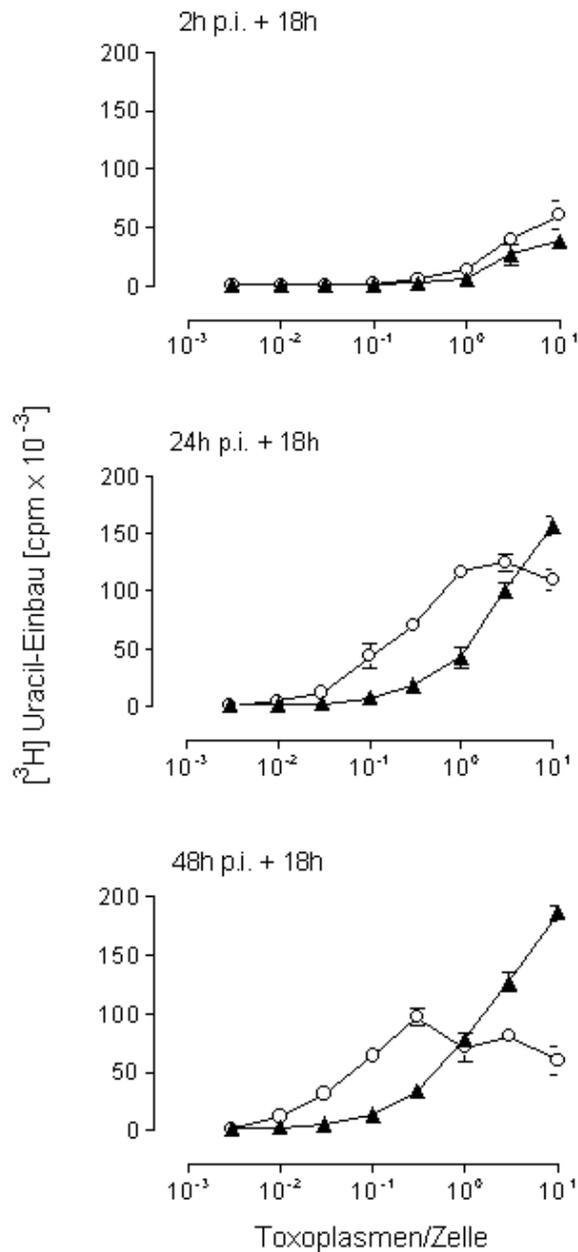


Abb. 18: Intrazelluläre Proliferation mausvirulenter und *in vitro* attenuierter Tachyzoiten des Isolates BK in L929-Fibroblasten

In 96-well Kulturplatten wurden L929-Fibroblasten mit virulenten (vBK ■) oder attenuierten (aBK □) Tachyzoiten des Isolates BK in einem Verhältnis von 0.003-10 Parasiten/Wirtszelle infiziert. Nach 2, 24 und 48 h wurden die Testkulturen mit ^3H -Uracil pulsmarkiert und für weitere 18 h kultiviert. Der Uracileinbau als Maß für die Proliferation der Toxoplasmen wurde in counts per minute (cpm) gemessen. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus Sechsfachbestimmungen eines Ansatzes. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten reproduziert. Kontrollansätze ohne Toxoplasmen ergaben < 1600 cpm.

Diesen unerwarteten Ergebnissen zufolge scheinen aBK Toxoplasmen *in vitro* ihre Wirtszellen schneller zu zerstören als vBK Toxoplasmen, was sich in dem initial stärkeren,

jedoch aufgrund des Wirtszellverlustes alsbald zügig schwächer werdenden ^3H -Uracil-Einbau zeigt. Die vBK Toxoplasmen hingegen scheinen deutlich länger in ihren Wirtszellen zu verbleiben, ohne sie zu zerstören, und sie nehmen dabei deutlich mehr ^3H -Uracil auf.

5.2.2 Infektionsrate

Die Ergebnisse des Toxoplasmen-Proliferationstests legten die Frage nahe, welche Faktoren bei den attenuierten Toxoplasmen zu der frühzeitigen Lyse der Wirtszellen führen. Um ein genaueres Bild von der Vermehrung der Toxoplasmen innerhalb der Zellkultur zu erhalten, wurden Objektträger-Kulturen der Fibroblastenlinie HS27 mit aBK oder vBK Tachyzoiten infiziert. Während der folgenden 48 h wurden die Testkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und gefärbt. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde der Prozentanteil der infizierten Zellen und die Zahl der Parasiten/Wirtszelle ermittelt (Tabelle 3).

Unabhängig davon, ob die Testkulturen mit aBK oder vBK Parasiten infiziert worden waren, war der Prozentanteil der infizierten Zellen 4 h und 8 h nach der Inokulation in beiden Gruppen ähnlich. Die Zahl der intrazellulären Parasiten war zu diesen Zeitpunkten ebenfalls vergleichbar. Nach 24 h war der Prozentanteil der infizierten Zellen in den mit aBK inokulierten Kulturen stark angestiegen. Im Vergleich dazu war in den mit vBK infizierten Kulturen ein deutlich geringerer Anstieg der Infektionsrate zu beobachten. Die Zahl der Parasiten/Wirtszelle blieb, unabhängig davon, auf gleichem Niveau. Nach 48 h waren in den mit aBK Parasiten infizierten Testkulturen fast alle Wirtszellen lysiert. In den mit vBK Parasiten infizierten Kulturen waren zu diesem Zeitpunkt alle Wirtszellen infiziert und trugen große parasitophore Vakuolen. Jedoch war erst ein geringer Anteil der Wirtszellen lysiert (Abbildung 19).

Im Kontext mit den Ergebnissen der Proliferationstests ist naheliegend, dass die attenuierten Toxoplasmen schneller proliferieren als die virulenten. Durch ihre verkürzte intrazelluläre Verweildauer werden die Wirtszellen früher lysiert, was das limitierte Wachstum der aBK Parasiten zum Ende des Proliferationstests erklärt. Eine schnellere Wirtszellinvasion durch die aBK Parasiten ist aufgrund des in beiden Gruppen über 8 h nahezu gleichen Prozentanteils infizierter Zellen unwahrscheinlich. Die höhere Zahl der infizierten Wirtszellen 24 h nach Infektion ist durch die schnellere Verteilung der aBK Parasiten innerhalb der Kultur zu erklären.

Zeit p.i.	Variante	% infizierte Zellen	Parasiten/Wirtszelle
4 h	aBK	28.2 ± 1.7	2.7 ± 1.6
	vBK	29.3 ± 2.2	2.2 ± 1.5
8 h	aBK	62.2 ± 6.1	5.6 ± 3.2
	vBK	58.8 ± 4.7	5.3 ± 3.7
24 h	aBK	80.0 ± 4.5	14.8 ± 6.1
	vBK	65.3 ± 15.4	14.8 ± 4.9

Tab. 3: Wirtszellinvasion und intrazelluläre Vermehrung von aBK und vBK Tachyzoiten

Objektträger-Kulturen konfluenter HS27-Fibroblasten wurden mit 10 aBK oder vBK Tachyzoiten/Wirtszelle inokuliert. Nach 4, 8 und 24 h wurden die Testkulturen fixiert und nach Diff-Quick-Protokoll gefärbt. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde der Prozentanteil infizierter Zellen aus 200 Zellen ermittelt. Zudem wurde die Zahl intrazellulärer Parasiten in 100 infizierten Zellen bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte ± SD von Dreifachbestimmungen.

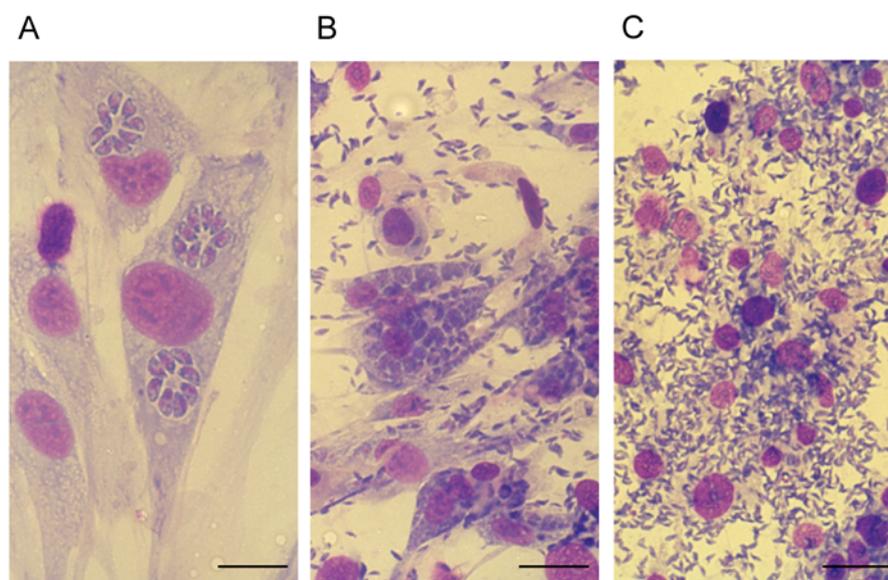


Abb. 19 : Intrazelluläre Vermehrung von virulenten und attenuierten Tachyzoiten des Isolates BK

Konfluente HS27-Fibroblasten in Objektträgerkulturen (10^5 Zellen/Kammer) wurden mit zehn virulenten (vBK) oder attenuierten (aBK) Tachyzoiten/Wirtszelle infiziert. Nach weiteren 4, 8, 16, 24 und 48 h wurden die Testkulturen fixiert und Diff-Quick-gefärbt. (A) Wirtszelle 16 h nach Infektion mit vBK (630fache Vergrößerung, der Balken entspricht 20 μm); Kultur 48 h nach Infektion mit vBK (B) bzw. aBK (C) (400fache Vergrößerung, die Balken entsprechen 30 μm).

5.3 Proteomvergleich

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Virulenz der aBK Toxoplasmen könnte in einer veränderten Stoffwechselleistung liegen. Mit dem Ziel exkretorische *Toxoplasma*-Proteine zu identifizieren, deren Synthese infolge der Attenuierung quantitativ oder qualitativ verändert ist, wurden vergleichende Proteomanalysen von aBK und vBK Tachyzoiten durchgeführt.

5.3.1 Eindimensionale Proteinauftrennung

In einem ersten Schritt wurde TLA aus aBK und vBK Tachyzoiten in einer eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt und die resultierenden Proteinmuster im Coomassie-gefärbten Gel verglichen.

Die Proteinbandenmuster von aBK und vBK Toxoplasmen unterscheiden sich quantitativ und qualitativ (Abbildung 20). So sind z.B. bei der Auftrennung der aBK Toxoplasmen im Molekulargewichtsbereich von 21–31 kDa, insbesondere bei 29 kDa, verschiedene im Vergleich deutlich schwächere Proteinbanden sichtbar. Bei etwa 24 kDa zeigt die Auftrennung der vBK Toxoplasmen eine Bande, die im Proteinmuster der aBK Toxoplasmen fehlt.

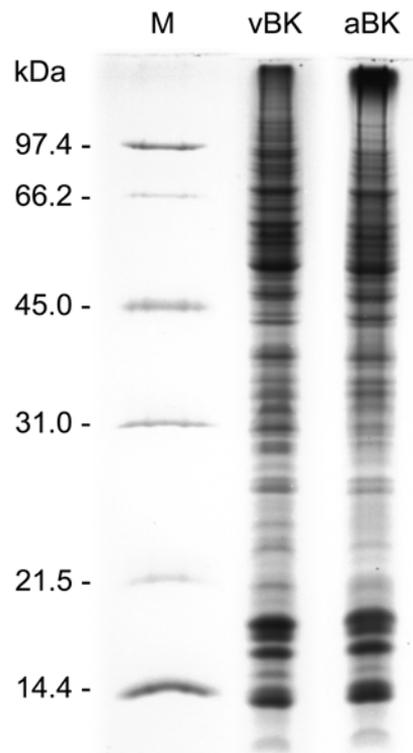


Abb. 20: Eindimensionale SDS-PAGE von TLA aus aBK und vBK Toxoplasmen

In einer eindimensionalen SDS-PAGE wurde TLA (60 µg/Spur) aus aBK und vBK Toxoplasmen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (vgl. II.6.1). Das Gel wurde nach der Elektrophorese Coomassie-gefärbt. M – Molekulargewichtsstandard.

5.3.2 Zweidimensionale Proteinauftrennung

Die orientierende eindimensionale Proteinauftrennung zeigte Unterschiede des Proteinbandenmusters von aBK und vBK Toxoplasmen. In einem zweiten Schritt wurde überprüft, ob im Molekulargewichtsbereich der unterschiedlich ausgeprägten Proteinbanden Veränderungen im Bereich einzelner Proteine nachweisbar sind. Dazu wurden Tachyzoiten-Lysate beider Varianten in einer hochauflösenden zweidimensionalen SDS-PAGE nach Ladung und Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung der Gele konnten mehr als 300 verschiedene Protein-Spots unterschieden werden.

Der Vergleich des zweidimensional aufgetrennten Proteinmusters von aBK und vBK Toxoplasmen zeigt deutlich quantitative und qualitative Unterschiede im Bereich einzelner Proteine (Abbildung 21). Bereits bei oberflächlicher Betrachtung sind zahlreiche Spots erkennbar, deren Proteingehalt im Lysat aus aBK Tachyzoiten vermindert ist. Auffällig ist insbesondere die stark reduzierte Größe des dominanten GRA7-Spots bei 29 kDa und pI 4.8. In einer computergestützten vergleichenden densitometrischen Analyse von jeweils sieben zweidimensionalen Coomassie-gefärbten Gelen wurden 200 Protein-Spots/Gel untersucht. Dabei wurden insgesamt 23 Protein-Spots gefunden, darunter auch GRA7, deren Proteingehalt im Lysat aus aBK Tachyzoiten um mehr als 50 % verringert ist. Bei 12 weiteren Spots zeigte sich ein im Vergleich zum vBK Lysat um mehr als 50 % erhöhter Proteingehalt (Dytnerska 2002, Nischik *et al.* 2001). Diese Ergebnisse beweisen unsere Hypothese einer

unterschiedlichen Aktivität des Proteinstoffwechsels von attenuierten und virulenten Toxoplasmen. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine generelle Veränderung des Produktionsniveaus aller Proteine, sondern um eine selektive Verringerung oder Steigerung der Expression einzelner Proteine.

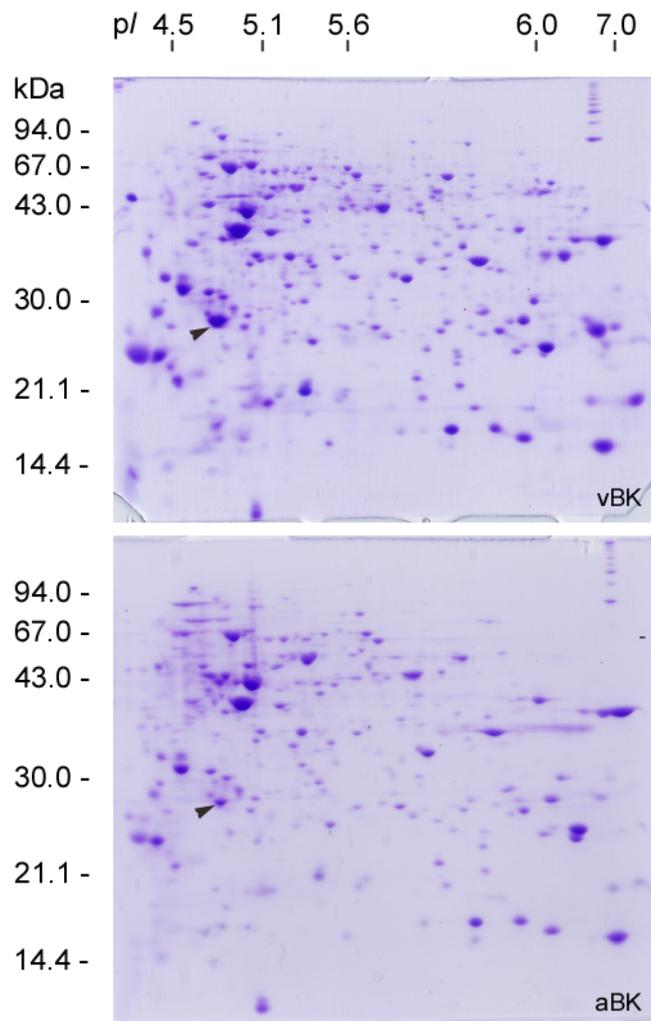


Abb. 21: Zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung von TLA aus virulenten und attenuierten Toxoplasmen

TLA (2 mg) aus vBK oder aBK Toxoplasmen wurde in der ersten Dimension in einem nicht linearen Gradienten von pH 3 – 10 entsprechend der Ladung (pI) von sauer nach basisch isoelektrisch fokussiert (vgl. II.6.2). In der zweiten Dimension wurden die Proteine nach Molekulargewicht getrennt. Das Molekulargewicht und der pI einzelner Protein-Spots wurden in den Coomassie-gefärbten Gelen durch Vergleich mit entsprechenden Standards bestimmt. Die Pfeilspitzen markieren die Position des dominanten GRA7-Spots bei 29 kDa und pI 4,8.

5.4 Gehalt an *dense granule* Antigenen

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die nach der Gelelektrophorese sichtbaren quantitativen Unterschiede bestimmten Proteinfamilien zuordnen lassen. Dazu wurde TFL aus aBK und vBK Tachyzoiten in einem ELISA titriert als Antigen eingesetzt und der Gehalt verschiedener Antigene, repräsentativ für die entsprechende Proteinfamilie, mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper verglichen. Bestimmt wurde der Gehalt des Oberflächenantigens SAG1, der *dense granule* Proteine GRA1-GRA7, S16, NTPase, der Rhoprienproteine ROP1-ROP4 und des Mikronemenproteins MIC3.

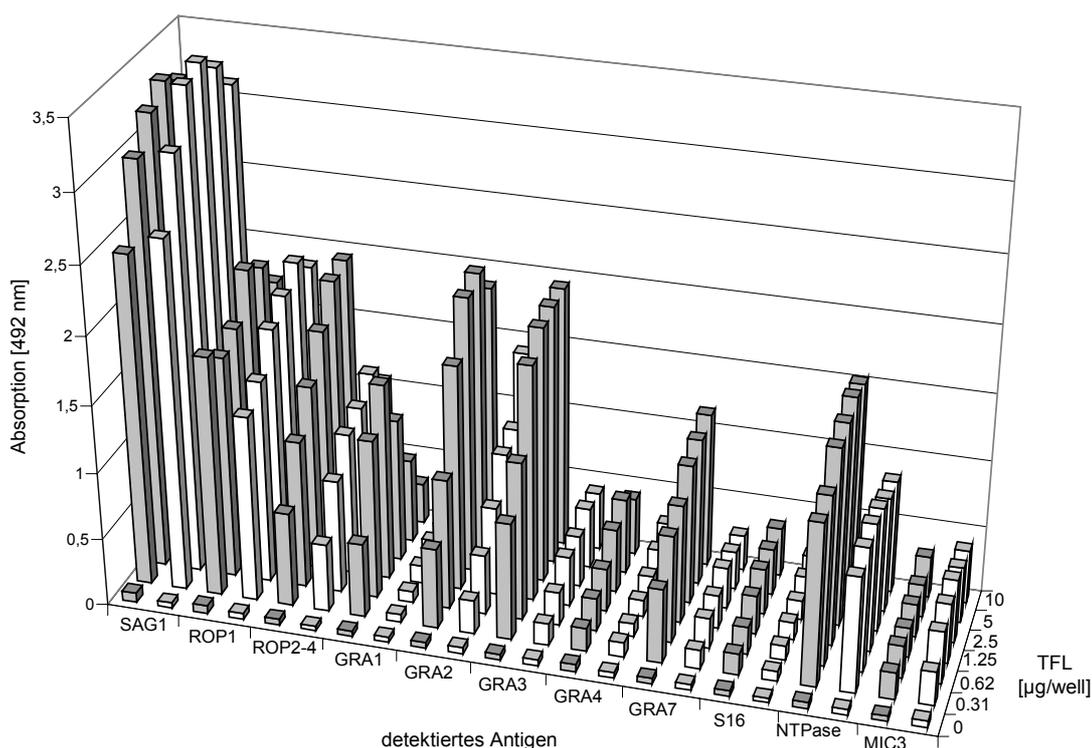


Abb. 22: Antigengehalt von Lysaten aus aBK und vBK Toxoplasmen

TFL aus aBK (□) und vBK (■) Tachyzoiten wurde in einem ELISA von 10–0.3 µg/well titriert als Antigen angelagert. Zum Nachweis der *T. gondii*-Antigene SAG1, GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA7, S16, NTPase, ROP1, ROP2,3,4 und MIC3 wurden spezifische mAk als Primärantikörper eingesetzt (vgl. II.1.5). Die Kontrollwerte ohne Primärantikörper bzw. ohne Antigen lagen unterhalb von 0.070. Dargestellt sind die Mittelwerte von Zweifachbestimmungen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei Experimente, die mit unabhängig voneinander präparierten Lysaten durchgeführt wurden. In Lysaten aus aBK Tachyzoiten (10-1.25 µg/well) wurde ein signifikant erhöhter Gehalt ($p < 0.01$) des Antigens MIC3, ein signifikant verminderter Gehalt ($p < 0.01$) der Antigene ROP2-4, GRA1, GRA2 und NTPase sowie ein hochsignifikant verminderter Gehalt ($p < 0.005$) der Antigene GRA3 und GRA7 ermittelt.

Der Gehalt aller untersuchten *dense granule* Proteine (GRA1–GRA7, S16 und NTPase) ist in aBK Tachyzoiten vermindert (Abbildung 22). Der Gehalt der Rhoprienproteine ROP2-4 ist ebenfalls deutlich reduziert. Der Gehalt des Mikronemenproteins MIC3 ist jedoch erhöht.

Lysate aus aBK und vBK Tachyzoiten enthalten vergleichbare Mengen der Proteine SAG1 und ROP1.

In weiterführenden Untersuchungen wurde durch zweidimensionale Western Blot-Analysen die Herabregulation der Produktion von GRA2, GRA5, und GRA7 in den attenuierten Toxoplasmen bestätigt und zudem eine Verminderung des Gehaltes an GRA8 und MIC5 entdeckt. Die Ergebnisse zeigen eine selektive Reduktion des Produktionsniveaus insbesondere der *dense granule* Proteine in den attenuierten Toxoplasmen.

5.5 GRA7-Antigenmuster in aBK und vBK Tachyzoiten

Der Proteomvergleich in zweidimensionaler SDS-PAGE und ELISA hat gezeigt, dass Lysate aus aBK Toxoplasmen weniger GRA7 enthalten als Lysate aus vBK Toxoplasmen. Vergleichende Western Blot Analysen nach ein- bzw. zweidimensionaler SDS-PAGE von TLA sollten nun zeigen, ob sich das Antigenmuster von GRA7 durch die Attenuierung verändert hat.

5.5.1 Antigenmuster im eindimensionalen Western Blot

Zunächst wurde in Western Blot-Analysen nach eindimensionaler SDS-PAGE von TLA nach Hinweisen auf ein verändertes GRA7-Antigenmuster in aBK Tachyzoiten gesucht. Dazu wurde das Antigen mit den GRA7-spezifischen mAk 5-241-178, TxE2 und BATO214 durch Immunfärbung nachgewiesen.

Alle GRA7-spezifischen mAk erkennen ein 29 kDa Antigen. Die mAk 5-241-178 und TxE2 weisen geringere Mengen dieses Antigens im Lysat aus aBK Tachyzoiten nach, der mAk BATO214 erkennt hingegen in beiden Lysaten vergleichbare Antigenmengen (Abbildung 23). Die mAk 5-241-178 und BATO214 erkennen identische Antigenmuster mit weiteren Banden bei etwa 32 kDa, 25 kDa, 21 kDa und 18 kDa. Bei den nicht in jeder Auftrennung oberhalb von 29 kDa im Western Blot auftretenden Signalen könnte es sich um höhermolekulare Isoformen von GRA7 handeln. Im Lysat aus aBK Tachyzoiten detektieren beide Antikörper kein Antigen bei 25 kDa und weisen geringere Mengen des 18 kDa Antigens nach. Der mAk BATO214 detektiert im aBK-Lysat eine stärkere Bande bei 21 kDa, der mAk 5-241-178 weist dort eine im Vergleich zum vBK-Lysat schwächere Bande nach. Auch bei der Immunfärbung mit dem mAk TxE2 wurden schwache Banden bei 32 kDa und 25 kDa beobachtet, die hier jedoch aufgrund der Schwäche des Signals nicht zur Darstellung kommen. Die Banden bei 25 kDa, 21 kDa und 18 kDa konnten nicht in allen mit diesen Antikörpern durchgeführten Western Blot-Analysen reproduziert werden. Es könnte sich hierbei um Abbauprodukte des Proteins handeln. Die geringfügige Verschiebung des Bandenmusters im unteren Molekulargewichtsbereich, insbesondere der Banden bei etwa 18 kDa, ist durch einen ungleichmäßigen Verlauf der Lauffront bei der Elektrophorese bedingt.

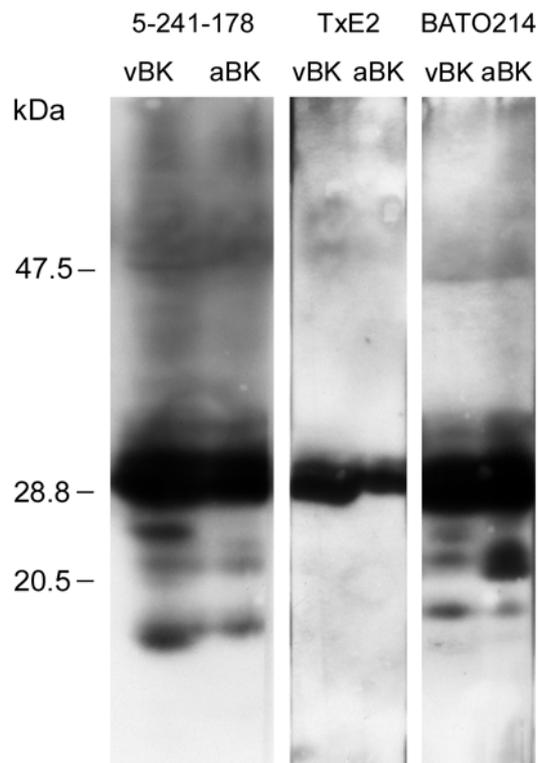


Abb. 23: Antigenmuster von aBK und vBK Tachyzoiten im eindimensionalen Western Blot

TLA aus aBK und vBK Toxoplasmen (80 µg/Spur) wurde unter reduzierenden Bedingungen in einer eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt. In Western Blot-Analysen wurde GRA7 mit den spezifischen mAk 5-241-178, TxE2 und BATO214 nachgewiesen.

5.5.2 Antigenmuster im zweidimensionalen Western Blot

Durch zweidimensionale Western Blot-Analysen wurde überprüft, ob die bei der eindimensionalen Western Blot-Analyse aufgetretenen Unterschiede in den Antigenmustern von aBK und vBK Tachyzoiten einzelnen definierten Antigenspots zugeordnet werden können. Dazu wurde TLA aus aBK oder vBK Tachyzoiten in einer präparativen zweidimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt. Um Blotmembranen mit identischem Proteinstern zu erhalten, wurden die Proteine aus einem Coomassie-gefärbten Gel nacheinander auf zwei verschiedene Membranen transferiert. Auf jeder dieser Membranen wurde GRA7 mit einem anderen mAk nachgewiesen. Auf diese Weise war es möglich, die durch zwei verschiedene mAk erkannten Antigenmuster auf der Basis eines identischen Proteinsterns zu untersuchen. Um einen ungleichmäßigen Proteintransfer als Ursache eines unterschiedlichen Antigenmusters auszuschließen, wurde GRA7 mit jedem Antikörper auf einer Blotmembran aus dem ersten und zweiten Transfer inkubiert. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der Immunfärbung mit den GRA7-spezifischen mAk TxE2, 5-241-178 und BATO214.

Alle drei mAk erkennen in aBK und vBK Tachyzoiten-Lysaten die drei bereits erwähnten GRA7-Hauptspots im Bereich von pI 8-4.8: 1) pI 3.8, 29 kDa, 2) pI 4.8, 29 kDa, 3) pI 4.4, 25 kDa.

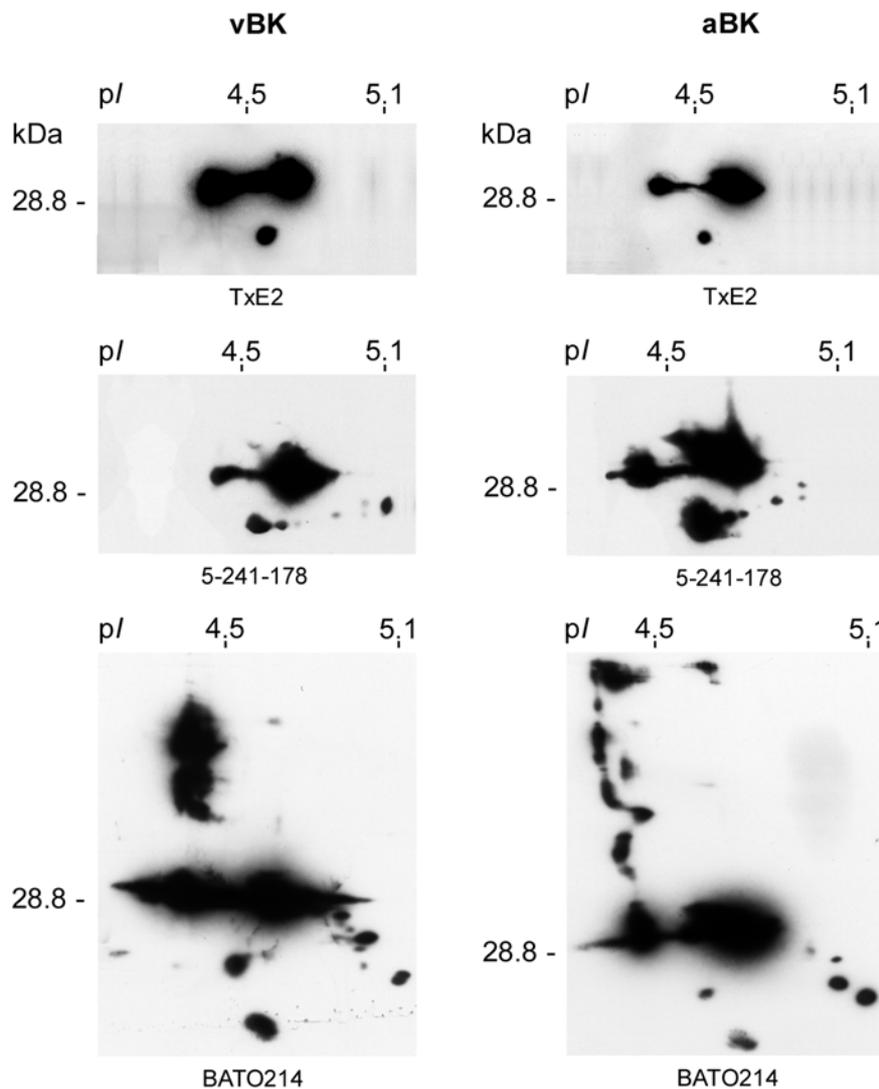


Abb. 24: GRA7-Antigenmuster in zweidimensional aufgetrennten Lysaten aus aBK und vBK

TLA aus aBK und vBK Tachyzoiten (2 mg) wurde in einer zweidimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt. In Western Blot-Analysen wurde GRA7 mit den spezifischen mAk 5-241-178, TxE2 und BATO214 nachgewiesen.

Die Immunfärbung mit allen drei mAk betont bei beiden *T. gondii* Stamm-Varianten das Signal bei pI 4.8 und 29 kDa. In den Coomassie-gefärbten Gelen beider Varianten ist der Proteinspot bei pI 3.8 und 29 kDa nicht sichtbar. Neben den drei Hauptspots erkennen 5-241-178 und BATO214 mehrere Nebenspot mit geringerem Molekulargewicht und mit pI-Werten oberhalb von 4.8. Der mAk BATO214 markiert bei pI 4.8 weitere Spots oberhalb von 29 kDa. Die Nebenspot konnten allerdings nicht in allen mit diesen mAk durchgeführten Western Blot-Analysen reproduziert werden. Es könnte sich hierbei um Abbau-produkte bzw. um Aggregate des GRA7-Moleküls handeln. Zum Nachweis der GRA7-Identität wurden die einzelnen reaktiven Nebenspot mit einem Molekulargewicht unterhalb von 29 kDa aus zweidimensionalen Coomassie-gefärbten Proteingelen ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Homologien zur GRA7-Aminosäuresequenz

überprüft. In solchen Nebenspots ließen sich Partialhomologien zur GRA7-Sequenz von bis zu 20 % feststellen, was die Hypothese, dass es sich hierbei um Abbauprodukte handeln könnte, stützt.

IV. Diskussion

Bei der Suche nach neuen sekretorischen Antigenen von *T. gondii* wurde in unserer Arbeitsgruppe das *dense granule* Protein GRA7 identifiziert (Fischer *et al.* 1998). Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen haben zur Charakterisierung der biologischen und immunologischen Eigenschaften dieses Proteins beigetragen. GRA7 wurde als Zielantigen der intrazerebralen Immunantwort identifiziert. Durch Eitopanalysen mit GRA7-spezifischen monoklonalen Antikörpern war es möglich, Antikörperbindungsstellen auf der GRA7-Proteinsequenz zu lokalisieren und somit B-Zell-stimulatorische Teilsequenzen des Proteins einzugrenzen. Vergleichende Proteom- und Antigenanalysen von mausvirulenten und attenuierten Toxoplasmen identifizierten GRA7 darüberhinaus als ein Virulenz-assoziiertes Protein.

1 GRA7 ist ein Zielantigen der intrazerebralen Immunantwort während der chronischen Infektion

Während der chronischen Phase der Infektion eines Zwischenwirtes persistiert *T. gondii* hauptsächlich im ZNS. Dort sind T-Lymphozyten entscheidend an der Immunabwehr gegen *T. gondii* beteiligt. Ruhende T-Zellen können die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Aktivierte T-Zellen wandern aus der Peripherie in das ZNS und werden durch die dort anwesenden antigenpräsentierenden Zellen stimuliert. CD8-positive T-Zellen kontrollieren dabei die Verbreitung der Parasiten und CD4-positive T-Zellen verhindern die Reaktivierung von Zysten. Das von beiden T-Zell-Subpopulationen sezernierte IFN- γ ist ein Schlüsselmediator in der Kontrolle der Infektion (Übersicht in: Däubener u. Hadding 1997).

Kürzlich wurde an Mäusen beobachtet, dass in der chronischen Phase der *Toxoplasma*-Enzephalitis die Rekrutierung von T-Zellen aus der Peripherie eingestellt wird. Es wurde gezeigt, dass sich in der Übergangsphase von der akuten zur chronischen Infektion bei intrazerebralen T-Zellen das Expressionsniveau verschiedener Rezeptoren und Zytokine verändert. CD4-positive T-Zellen exprimieren z.B. in der chronischen Phase weniger IFN- γ als in der akuten Phase der Infektion. Der Nachweis einer gesteigerten Expression anti-apoptotischer sowie einer reduzierten Expression pro-apoptotischer Moleküle führte zu der Annahme, dass die Zahl der T-Zellen im Gehirn allmählich durch Apoptose reduziert wird. Dabei werden die T-Zell-Infiltrate jedoch nicht vollständig aufgelöst (Schlüter *et al.* 2002).

Welche parasitären Antigene die zelluläre Immunantwort in der chronischen Phase der Infektion stimulieren, ist noch nicht geklärt. Die zu den sekretorischen Antigenen zählenden *dense granule* Proteine sind starke Immunogene. Unter den *dense granule* Proteinen nimmt GRA7 eine Sonderstellung ein, da es nicht nur als einziges *dense granule* Protein in allen infektiösen Stadien exprimiert wird, sondern auch als einziges bisher bekanntes *T. gondii*-Protein aus infizierten Zellen auf die Wirtszelloberfläche exportiert wird (Fischer *et al.* 1998, Stachelhaus 2001). Bisher wurde eine Stimulation von peripheren T-Zellen oder T-Zell-Klonen durch die *dense granule* Antigene GRA1, GRA2 und GRA4 sowie durch das Oberflächenprotein SAG1 und die Rhoprienproteine ROP2 und ROP9 nachgewiesen (Übersicht in: Fischer *et al.* 1996, Prigione *et al.* 2000, Reichmann *et al.* 2002). Durch DNA-Vakzinierung gegen GRA1, GRA7 und ROP1 konnte in resistenten C3H Mäusen eine Typ 1-Immunantwort induziert werden, die 70 %, 50 % bzw. 90 % der Tiere vor einer letalen Infektion schützte. Auf eine Stimulation mit TLA reagierten Milzzellen aus vakzinierten Tieren mit Proliferation und Sekretion des Typ1-Zytokins IFN- γ (Vercammen *et al.* 2000).

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, CD4-positive T-Lymphozyten aus den Gehirnen chronisch-infizierter Mäuse zu isolieren und *in vitro* deren Aktivierung durch *T. gondii*-Antigene nachzuweisen. Auf eine Stimulation mit TLA reagierten die CD4-positiven Hirn-T-Zellen und Milz-T-Zellen durchgängig mit Proliferation und der Sekretion von IFN- γ (vgl. III.1.1). Trotz der eindeutigen TLA-Reaktivität konnte jedoch eine GRA7-spezifische Aktivierung dieser Zellen nicht nachgewiesen werden.

Der fehlenden GRA7-Reaktivität der CD4-positiven T-Zellen können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Die T-Zell-Immunogenität eines Proteins wird insbesondere durch die Proteinbereiche bestimmt, die ein T-Zell-Epitop flankieren. Abweichungen von der Struktur bzw. der Sequenz des nativen Proteins können zu Veränderungen der Antigenverarbeitung durch antigenpräsentierende Zellen führen. Dadurch kann dann die Bindungprozessierter Peptide an MHC-Moleküle oder an einen T-Zell-Rezeptor behindert werden. Die zur Stimulation der Zellen verwendeten Antigenpräparationen enthielten kein natives Protein, sondern entweder elektroeluiertes denaturiertes oder rekombinantes GRA7. Rekombinante Proteine sind bedingt durch bakterielle Kontaminanten nur eingeschränkt tauglich als Antigen in T-Zell-Proliferationstests. Bei dem rekombinanten GRA7 weicht zudem die Aminosäuresequenz N-terminal von der des nativen Proteins ab (Jacobs *et al.* 1998). Die Ursache einer fehlenden T-Zell-Antwort kann aber auch auf der Seite des Wirtes liegen. Träger verschiedener MHC-Allele unterscheiden in der Verarbeitung und Erkennung von Antigenen. Dies kann sich darin äußern, dass bestimmte Proteinsequenzen nicht zu immunogenen Determinanten prozessiert werden können (Übersicht in: Moudgil *et al.* 1998; Bona *et al.* 1998). Zudem kann auch die Häufigkeit der für ein bestimmtes Antigen spezifischen T-Zellklone sehr gering sein. Eine fehlende Reaktivität der CD4-positiven T-Zellen bedingt nicht eine generelle GRA7-Areaktivität aller T-Zell-Populationen.

Schlüter *et al.* (2002) schlossen von der minimalen Proliferationsantwort intrazerebraler T-Zellen in Proliferationstests und fehlenden 5-bromo-2'-Deoxyuridin Aufnahme *in vivo*, dass T-Zellen im Gehirn chronisch infizierter Mäuse nicht proliferieren können. Dieser Befund wurde durch die Expression von Zellzyklus-Inhibitoren und die hemmende Aktivität intrazerebraler Makrophagen erklärt. Es wurde daraus gefolgert, dass die Zahl intrazerebraler T-Zellen allein durch Rekrutierung aus der Peripherie und nicht durch ihre lokale Proliferation reguliert wird. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass T-Zellen aus dem Gehirn chronisch infizierter Mäuse nach Stimulation mit *Toxoplasma*-Antigenen durchaus *ex vivo* proliferieren. An diesem Ergebnis könnte der Zusatz von IL-2 zu den Testkulturen beteiligt sein. Dieses Zytokin wirkt als Wachstumsfaktor für T-Zellen und schafft somit verbesserte Bedingungen für die Messung der Proliferation von T-Zellen aus dem Gehirn.

Alle bekannten T-Zell-Antigene von *T. gondii* wirken ebenfalls B-Zell-stimulatorisch. Insgesamt konnten bisher zahlreiche B-Zell-, jedoch nur wenige T-Zell-Antigene identifiziert werden. Zur Klärung dieser Frage könnten Proliferationstests und Zytokinsekretionsanalysen mit verschiedenen T-Zell-Subtypen und nativem GRA7 als Antigenstimulus beitragen.

Die Immunreaktivität des Liquors chronisch-infizierter Mäuse gegenüber rekombinantem GRA7 zeigte GRA7 als ein Zielantigen der intrazerebralen B-Zell-Antwort (vgl. III.1.2). Western Blot-Analysen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die in den Liquores enthaltenen Antikörper im Vergleich zu den korrespondierenden Seren eine geringere Anzahl von Antigenen erkennen, jedoch eine dominierende Reaktivität bei 29 kDa zeigen (Stachelhaus 2001). Ähnliche Unterschiede zwischen Liquor- und Serumreaktivität wurden auch bei AIDS-Patienten festgestellt, die an einer *Toxoplasma*-Enzephalitis erkrankt waren.

Die Antikörper in den humanen Liquores erkannten ebenfalls ein immundominantes 29 kDa Antigen (Contini *et al.* 1998). Hierbei könnte es sich um GRA7 handeln. Die von Contini vermutete Identität mit SAG1 ist eher unwahrscheinlich, da die B-Zell-Epitope von SAG1 unter reduzierenden Elektrophorese-Bedingungen zerstört werden (Velge-Roussel *et al.* 1994).

2 GRA7 ist ein immundominantes B-Zell-Antigen

GRA7 wird von *T. gondii*-Stämmen aller drei Subtypen (Stachelhaus 2001) und in allen infektiösen Parasitenstadien (Ferguson *et al.* 1999^a) exprimiert. GRA7 ist nicht nur in Mäusen, sondern auch im Menschen ein dominantes Zielantigen der Immunantwort in der akuten und chronischen Phase der Infektion. In 65-79 % der Seren chronisch-infizierter und etwa 94 % der Seren akut-infizierter Patienten sind GRA7-spezifische Antikörper nachweisbar (Jacobs *et al.* 1998).

Die Aminosäuresequenz gibt keine Hinweise auf die Funktion, die das Protein im Parasiten oder in der Wirtszelle ausüben könnte. Es besteht eine Sequenzhomologie zu NCDG1, einem *dense granule* Protein des *T. gondii* nahe verwandten tierpathogenen Protozoon *Neospora caninum* (Fischer *et al.* 1998).

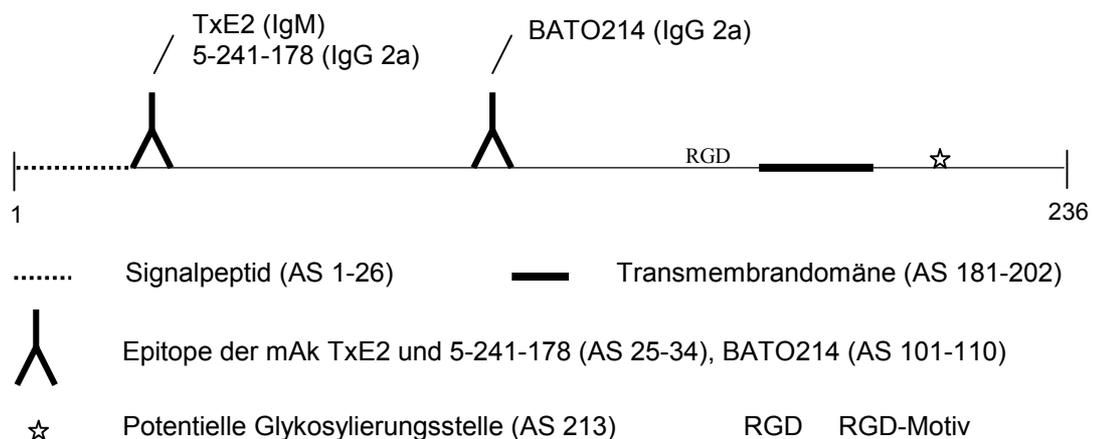


Abb. 25: Antigene Bereiche der GRA7-Primärstruktur

Schematische Darstellung der GRA7-Primärstruktur und der kartierten Antikörperepitope.

Obwohl die mAk TxE2 und 5-241-178 das gleiche Epitop erkennen, reagiert nur TxE2 nicht mit rekombinantem GRA7 (vgl. III.4.2). Diesem Befund können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Das rekombinante Protein enthält anstelle der ersten vier N-terminalen Aminosäuren ein 25 Aminosäuren umfassendes Fragment des murinen Tumornekrosefaktors gefolgt von sechs Histidylresten (Jacobs *et al.* 1999). Histidin ist eine heterozyklische Aminosäure mit einem vergleichsweise großem Moleküldurchmesser. Diese „sperrigen“ Aminosäuren könnten die Struktur des Proteins beeinflussen und auf diese Weise den freien Zugang eines Antikörpers zu seinem Epitop behindern. Das TxE2 bzw. 5-241-178-Epitop befindet sich in direkter Nachbarschaft der Signalsequenz und des daran anschließenden TNF-Histidyl-Restes. Wenn die Antikörperbindungsstelle durch die flankierende Aminosäuren teilweise überlagert wird, können kleine IgG-Moleküle mit hoher Affinität wie der mAk 5-241-178 noch an ihr Antigen binden. Es ist möglich, dass im Falle von TxE2 die

IgM-Moleküle aufgrund ihrer Größe und der zudem relativ geringeren Affinität das Epitop nicht mehr binden können. Sterische Behinderungen durch flankierende Aminosäurereste werden auch für die Interaktion von Proteinen und MHC-Molekülen bzw. T-Zell-Epitopen und T-Zell-Rezeptor beschrieben (Übersicht in: Moudgil *et al.* 1998). Da TxE2 ebenso wie 5-241-178 an einzelne GRA7-Peptide bindet, kann das Fehlen eines Konformationsepitopes als Ursache für die Nicht-Reaktivität von TxE2 mit dem rekombinanten Protein ausgeschlossen werden.

Die Mehrzahl der bekannten B- und T-Zell-Epitope zeigt eher hydrophile als hydrophobe Eigenschaften (Bona *et al.* 1998). Auch die drei untersuchten mAk erkennen Epitope in dem hydrophilen Sequenzbereich der Aminosäuren 25-110, der sich zwischen den hydrophoben Teilsequenzen von Signalpeptid und Transmembrandomäne befindet. In Epitopanalysen mit Hilfe verschiedener rekombinanter GRA7-Fragmente konnte keine Reaktivität *T. gondii*-reaktiver humaner Seren im Bereich der Aminosäuren 5-97 beobachtet werden (Jacobs *et al.* 1999). Die mAk TxE2 und 5-241-178 erkennen ihr Epitop innerhalb dieser Teilsequenz, was darauf hinweisen könnte, dass das Antigen im murinen und humanen Immunsystem unterschiedlich prozessiert oder präsentiert wird und somit verschiedene Teilsequenzen immunogen wirken. Die für Menschen wichtigste immunogene Region scheint im Bereich der Aminosäuren 97-146 zu liegen. Die Tatsache, dass dieser Antigenbereich mit Hilfe synthetischer GRA7-Peptide und humaner Immunsereen nicht weiter eingegrenzt werden konnte, führte zu der Annahme, dass das durch humane B-Zellen erkannte immundominante Epitop eine wichtige strukturelle Komponente beinhaltet (Jacobs *et al.* 1999).

Vergleichende Untersuchungen der Antikörperreaktivitäten mit zweidimensional aufgetrenntem *Toxoplasma*-Lysat ergaben für die mAk TxE2, BATO214 und 5-241-178 jeweils drei reaktive Hauptspots. Zwei Spots wurden bei 29 kDa detektiert, wobei der dominante Spot einen *pI* von 4.8 und der zweite Spot bei einem *pI* von etwa 4.2 liegt. Der dritte Spot liegt bei 25 kDa und *pI* 4.6. Im Wesentlichen erkennen alle drei Antikörper das gleiche Antigenmuster. Bei den durch die mAk 5-241-178 und BATO214 erkannten Nebenspot mit geringerem Molekulargewicht als die Hauptspots könnte es sich um Abbauprodukte bzw. Fragmente von GRA7 handeln. Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ließen sich auch in solchen Nebenspot Partialhomologien zur GRA7-Sequenz feststellen, was die Hypothese, dass es sich hierbei um Abbauprodukte handeln könnte, bestätigt.

Durch Fraktionierungs- und Solubilisierungsstudien wurde nachgewiesen, dass GRA7 ein integrales Membranprotein extrazellulärer Toxoplasmen ist, das membrangebunden auf die Oberfläche von Wirtszellen exportiert wird. In Lysaten infizierter Wirtszellen wurden weitere GRA7-Formen mit Molekulargewichten von etwa 32, 34 und 36 kDa detektiert (Stachelhaus 2001). Es wird diskutiert, dass es sich bei diesen im elektrischen Feld langsamer wandernden Proteinen um nach der Sekretion z.B. durch Glykosylierung oder Phosphorylierung modifizierte GRA7-Formen handelt. Bei den nicht in jeder Auftrennung oberhalb von 29 kDa im Western Blot auftretenden Signalen (vgl. Abbildung 23) könnte es sich um solche modifizierten GRA7-Formen handeln, die sich präparationsabhängig im Gesamtlisat befinden. Versuche zur enzymatischen Deglykosylierung von GRA7 mit N-Glukosidase F ergaben keine Hinweise auf eine Glykosylierung. In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich eine Phosphorylierung der höhermolekularen GRA7-Isoformen gezeigt werden (nicht publiziert).

Die bisher über die Immunogenität von GRA7 in verschiedenen Labors gewonnenen Erkenntnisse identifizieren GRA7 als ein dominantes Zielantigen der Immunantwort. Das Vorhandensein spezifischer mAk und die Kenntnis der Epitope ermöglicht differenzierte

Analysen zur Lokalisation, Membrantopologie und zum Transport des Proteins. Die Informationen über die immunogenen Bereiche können einerseits zur Entwicklung von Testsystemen für Patientenmaterial genutzt werden, andererseits ist die Entwicklung von Vakzinen ein möglicher Einsatzbereich. Durch Immunisierung mit sekretorischen Proteinen, rekombinanten Proteinen und durch DNA-Vakzinierung gegen die *dense granule*-Antigene GRA1 und GRA7 konnte im Tiermodell bereits eine Immunantwort mit partiellem Schutz vor einer letalen Infektion induziert werden (Übersicht in Cesbron-Delauw *et al.* 1996; Vercammen *et al.* 2000).

3 Langzeitkultivierung führt zur Attenuierung virulenter Toxoplasmen

Die Virulenz von *T. gondii* ist sicherlich ein multifaktorielles, von Parasiten- und Wirtszell-determinanten beeinflusstes Phänomen. Obwohl durch vergleichende Untersuchungen der *T. gondii*-Subtypen eine Reihe Virulenz-assoziiierter genetischer Marker identifiziert werden konnten, ist noch weitgehend unbekannt, welche Faktoren die Pathogenität des Parasiten ausmachen. Attenuierte Parasiten bieten die Möglichkeit, Virulenzfaktoren bzw. -mechanismen im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen. Als Lebendvakzine eingesetzt, sind sie in der Veterinärmedizin zudem wirksame Instrumente zur Kontrolle von Parasitosen. Für verschiedene protozoische Parasiten wie z.B. *Theileria annulata* wurde ein Verlust der Virulenz durch kontinuierliche Zellkulturpassage beschrieben (Darghouth *et al.* 1996; Sommerville *et al.* 1998). Die für den Vorgang der Attenuierung benötigte Anzahl der Zellkulturpassagen ist bei *Theileria annulata* abhängig vom Grad der anfänglichen Virulenz und liegt bei etwa 100 bis 300 Passagen.

Toxoplasmen des mausvirulenten Isolates BK (Subtyp 1) sind über einen Zeitraum von einem Jahr (etwa 150 Passagen) kontinuierlich in Fibroblastenkulturen und alternativ in Mäusen passagiert worden. Bei den langzeitkultivierten Toxoplasmen konnte durch experimentelle Infektion von Mäusen eine Reduktion der Virulenz nachgewiesen werden, die sich in einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit und einer erhöhten Überlebensrate niederschlug (vgl. III.5.1). Die Virulenz in Mäusen war etwa 1000fach verringert. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, die mit Toxoplasmen des Isolates RH erzielt wurden, die auf andere Weise attenuiert wurden (Yano *et al.* 1986, Pfefferkorn u. Pfefferkorn 1976) und entspricht in etwa der eines Subtyp II-Isolates. Eine Konversion in oder eine Kontamination durch Subtyp II- oder Subtyp III-Toxoplasmen ist ausgeschlossen, da das Subtyp I-spezifische Epitop des *dense granule* Proteins GRA4 (Meisel *et al.* 1996) vorhanden war und keine Ausbildung von Gehirnzysten nachgewiesen werden konnte (Nischik *et al.* 2001). Das Ergebnis dieser Infektionsversuche beweist, dass dauerhafte Kultivierung bei *T. gondii* ebenso zur Attenuierung führt, wie dies für *Theileria annulata* beschrieben wurde.

Über die Mechanismen der Attenuierung protozoischer Parasiten ist bisher wenig bekannt. Die Selektion avirulenter Subpopulationen oder Genomrearrangements könnten hierbei eine Rolle spielen. Die verschiedenen Genotypen bzw. Phänotypen von *T. gondii* sind sehr stabil. Eine spontane Konversion von virulenten zu avirulenten Phänotypen oder umgekehrt wurde bisher nicht beschrieben (Übersicht in: Sibley *et al.* 1999).

Als mögliche Virulenzparameter wurden die Geschwindigkeit der intrazellulären Vermehrung *in vitro* gemessen (III.5.2.1) und die Invasivität der Parasiten über die Zählung infizierter Wirtszellen und der Einzelparasiten pro Zelle ermittelt (III.5.2.2). In der Regel

wachsen in Zellkulturen virulente *Toxoplasma*-Isolate schneller als avirulente (Dubey *et al.* 1998^b). Die Invasions- und die Wachstumsraten werden dabei durch den Wirtszelltyp beeinflusst. Obwohl sich die attenuierten Parasiten bei der Etablierung einer letal verlaufenden akuten Infektion *in vivo* als weniger effizient erwiesen, zeigten sie in Fibroblastenkulturen überraschenderweise ein schnelleres Wachstum. Bei attenuierten und virulenten Toxoplasmen wurden vergleichbare Infektions- und Replikationsraten beobachtet.

Diese Ergebnisse sprechen eher für eine verkürzte intrazelluläre Verweildauer als für eine gesteigerte invasive Potenz der attenuierten Toxoplasmen. Es könnte sich hierbei um eine Adaptation des Parasiten an die Kulturbedingungen handeln. Die Ursache für den verkürzten intrazellulären Aufenthalt könnte in einer verkürzten Latenzphase vor Beginn der Proliferation oder in einer verkürzten Verdopplungszeit mit folgender früherer Lyse der Wirtszellen liegen. In Bezug auf beide Zeitkomponenten bestehen auch zwischen verschiedenen Stämmen des Subtyps 1 deutliche Unterschiede (Appleford u. Smith 1997). Vergleichende Untersuchungen der Vermehrung virulenter Toxoplasmen *in vivo* und *in vitro* zeigten eine Veränderung des Wachstumsverhaltens in der Zellkultur. *In vivo* durchlaufen Tachyzoiten asynchrone Endodyogeniezyklen und sind aufgrund dessen meist haufenartig angeordnet. Sich schnell teilende zellkulturadaptierte Toxoplasmen können sich jedoch auch synchron teilen. Dabei entsteht eine rosettenartige Anordnung der Tachyzoiten innerhalb der PV (Dubey *et al.* 1998^c; Bommer 1969), die jedoch im vorliegenden Fall bei beiden Varianten gefunden wurde.

Der selektive Einbau von ³H-Uracil in die RNA und DNA intrazellulärer Toxoplasmen ist nicht nur eine Meßgröße für die Proliferation *in vitro*, sondern auch für die Stoffwechselaktivität der Parasiten. Bei attenuierten Toxoplasmen tritt der Zeitpunkt der maximalen Inkorporation früher ein. Die Menge des maximal aufgenommenen ³H-Uracils ist jedoch deutlich verringert. Im Kontext mit dem schnelleren Wachstum *in vitro* bei unbeeinflussten Infektions- und Replikationsraten könnte dies auf einen weitgehend auf die Replikation konzentrierten Stoffwechsel der attenuierten Toxoplasmen hinweisen. Es scheint plausibel, dass in den an die Zellkultur adaptierten Toxoplasmen zur Replikation notwendige Syntheseschritte aktiviert und nicht replikative Syntheseleistungen gedrosselt sind.

Toxoplasma hemmt die Apoptose seiner Wirtszellen. Kürzlich wurde gezeigt, dass die bei der Apoptose stattfindende Freisetzung von Cytochrom C, die darauf folgende Aktivierung von Caspasen und die Expression von Poly(ADP-Ribose)Polymerase durch eine Infektion mit Toxoplasmen reduziert wird (Goebel *et al.* 2001). Vor diesem Hintergrund wäre es möglich, dass die attenuierten Toxoplasmen die Fähigkeit zur Inhibition der Apoptose verloren haben und aus diesem Grunde ihre Wirtszellen früher absterben, während die Wildtyp-Toxoplasmen aufgrund dieser Fähigkeit länger innerhalb ihrer Wirtszellen verbleiben und proliferieren. Ob das frühzeitige Verlassen der Wirtszellen auf einen veränderten Metabolismus zurückzuführen ist, der das intrazelluläre Überleben begrenzt, oder das Ergebnis einer veränderten Wirtszell-Antwort ist, bleibt ungeklärt.

Als ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist die Fähigkeit zur Ausbreitung der Tachyzoiten innerhalb des Wirtsorganismus und die Fähigkeit zur Stadienkonversion zu überprüfen. Durch Zellkulturpassage attenuierte *Theileria annulata* Linien zeigen eine reduzierte Fähigkeit sich in schnell replizierende Parasitenstadien zu differenzieren und sich im Wirtsorganismus auszubreiten (Hall *et al.* 1999). Bei Toxoplasmen des Isolates RH, die durch Passage in mit *Toxoplasma*-Lysat immunisierten Mäusen attenuiert wurden, ist die Fähigkeit zur Bildung von Gewebezysten erhöht (Yano u. Nakabayashi 1986).

Eine intraperitoneale Infektion mit Typ1 Toxoplasmen löst in Mäusen eine eine starke lokale Immunantwort aus. Analysen des Peritonealexsudates nach Infektion mit mausvirulenten und attenuierten Toxoplasmen zeigten ähnliche Zellzahlen. Allerdings war die Zahl der mit attenuierten Toxoplasmen infizierten Peritonealexsudat-Zellen deutlich geringer als nach Infektion mit dem Wildtyp. Die Parasitenzahlen pro Einzelzelle waren jedoch vergleichbar. Eine Infektion mit attenuierten Toxoplasmen induzierte eine starke IL-12-Antwort, gefolgt von einer gesteigerten IFN- γ -Sekretion. In mit dem Wildtyp infizierten Mäusen war eine vergleichbare IL-12-Antwort frühestens zwei Tage später meßbar und es waren nur geringe Mengen IFN- γ nachweisbar (Nischik *et al.*). In Kombination mit der höheren Überlebensrate der Mäuse (vgl. Abbildung 17) zeigen diese Ergebnisse, dass die attenuierten Parasiten eine adäquate Immunreaktion auslösen, jedoch insgesamt weniger infektiös sind als der Wildtyp.

Ein wichtiger zu untersuchender Aspekt ist zudem die Reversibilität der Attenuierung. Die Virulenz, selbst avirulenter Toxoplasma-Isolate, läßt sich durch Passage in naiven Mäusen steigern (Pettersen 1977). Es stellt sich nun die Frage, ob sich die Virulenz attenuierter Toxoplasmen durch *in vivo*-Passage wieder herstellen läßt. Attenuierte *Theileria annulata* sind auch nach Transfer in einen Wirtsorganismus nicht mehr fähig, bestimmte Virulenzfaktoren zu produzieren (Hall *et al.* 1999).

Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse, dass schnelle Proliferation und Zerstörung von Wirtszellen nicht allein die Virulenz der Toxoplasmen bestimmen, sondern auch zahlreiche andere Faktoren wie die Expression von Virulenzfaktoren oder die Induktion einer überschießenden Immunantwort eine Rolle spielen. Kürzlich wurde gezeigt, dass die genetische Rekombination während der sexuellen Phase im Lebenszyklus von *T. gondii* zur Entwicklung virulenter Parasiten führen kann. Durch Kreuzung eines Subtyp II-Isolates mit einem Subtyp III-Isolat entstand eine Folgegeneration, deren Virulenz in der Maus 1000fach höher war als die jedes Parentalisolats (Grigg *et al.* 2001).

4 **Dense granule Proteine als putative Virulenzfaktoren**

Die Erkenntnisse über das Zellkulturverhalten der attenuierten Toxoplasmen gaben Hinweise auf eine veränderte Stoffwechselaktivität. Die Proteomanalysen bestätigten diese Hypothese. Mit der Identifizierung von Proteinen, deren Expression infolge der Attenuierung vermindert ist, war es möglich, das Phänomen der Virulenz auf Proteomebene zu betrachten. Der Vergleich des zweidimensional aufgetrennten Lysats attenuierter und virulenter Toxoplasmen zeigte deutliche quantitative und qualitative Unterschiede im Bereich einzelner Proteine (III.5.3.2). In einer computergestützten Analyse war der Proteingehalt des Lysats aus attenuierten Toxoplasmen in 23 von 200 untersuchten Spots um mehr als 50 % reduziert. Besonders auffällig war das stark reduzierte Volumen des dominanten GRA7-Spots bei 29 kDa und *pI* 4.8. Bei 12 weiteren Spots zeigte sich ein im Vergleich zum vBK Lysat um mehr als 50 % erhöhter Proteingehalt. Mittels ELISA wurde gezeigt, dass auch der Gehalt anderer bekannter *dense granule* Proteine wie GRA1-GRA4, S16 und NTPase in den attenuierten Toxoplasmen vermindert war (Nischik *et al.* 2001).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine selektive Verminderung der Synthese einzelner *dense granule* Proteine und sprechen gegen eine generelle Reduktion der Proteinbiosynthese in attenuierten Toxoplasmen. Eine mögliche Erklärung für diese Korrelation ist eine Abhängigkeit der Virulenz von einem hohen Expressionsniveau dieser Proteine. Eine Funktion der *dense granule* Proteine bei der Pathogenese ist somit denkbar. Eine gekoppelte

Regulation der Genexpression, die eine Erklärung für die parallele Reduktion der *dense granule* Proteine liefern würde, lies sich durch Analysen der Gen-Promotorsequenzen nicht bestätigen (Cesbron-Delauw 1996).

Die kontinuierliche Freisetzung von *dense granule* Proteinen, mit einem kurzfristigen Anstieg direkt nach der Wirtszellinvasion (Dubremetz *et al.* 1993, Chaturvedi 1999), deutet auf eine Funktion für das intrazelluläre Überleben oder die Vermehrung des Parasiten hin (Cesbron-Delauw 1996). Diese Hypothese stützend zeigten Toxoplasmen ein vermindertes Wachstum und eine reduzierte Proliferation in der Zellkultur, wenn ihre NTPase-Expression durch *antisense* RNA gehemmt wurde (Nakaar *et al.* 1999). Für das Enzym NTPase wurden Funktionen im Purinstoffwechsel und bei der Freisetzung der Parasiten aus den Wirtszellen postuliert. Virulente und avirulente Toxoplasmen exprimieren unterschiedliche NTPase-Isoenzyme. Avirulente Stämme exprimieren ausschließlich das Isoenzym I, virulente die Isoenzyme I und III (Silverman *et al.* 1998). In den vorliegenden Analysen war der NTPase I Gehalt der attenuierten Parasiten reduziert. Die Proliferation der Parasiten war jedoch nicht beeinträchtigt (Nischik *et al.* 2001).

Über biologische Funktionen der *dense granule* Proteine ist bisher wenig bekannt. Es stellt sich daher die Frage, ob diese Proteine die Virulenz von *T. gondii* vermitteln, oder ob ihre Synthese lediglich mit der Virulenz korreliert. Erste Erkenntnisse zur Virulenz-vermittelnden Funktion der *dense granule* Proteine wurden durch die Ausschaltung des GRA2-Gens in Toxoplasmen des Subtyp-Isolates RH gewonnen (Mercier *et al.* 1998). GRA2-defiziente Mutanten proliferierten unverändert in Zellkulturen, zeigten jedoch eine reduzierte Virulenz in Mäusen. Diese Tatsachen relativieren die Bedeutung der Vermehrung für die Pathogenese. Kürzlich wurde in Mäusen nachgewiesen, dass eine letale Infektion mit Subtyp I-Isolaten nicht allein auf die direkte Zerstörung der Gewebe durch den Parasiten zurückzuführen sind. Untersuchungen von Leber- und Milzgewebe letal infizierter Mäuse zeigten eine ausgeprägte Schädigung nicht infizierter Zellen. Solche Gewebeschäden werden durch lösliche parasitäre Faktoren und/oder durch induzierte wirtseigene Faktoren vermittelt (Mordue *et al.* 2001).

Welche Virulenz-vermittelnden Funktionen könnten *dense granule* Proteine haben? *Dense granule* Proteine sind starke T- und B-Zell-Immungene. CD4-positive T-Zellen aus Milz und Gehirn chronisch *T. gondii*-infizierter Mäuse hatten in Proliferationstests mit TLA aus attenuierten Toxoplasmen eine schwächere Proliferation gezeigt, als nach Stimulation mit TLA aus virulenten Toxoplasmen (Daten nicht gezeigt). Dieser Sachverhalt könnte auf die geringere Konzentration von *dense granule* Proteinen in Lysaten aus attenuierten Toxoplasmen zurückzuführen sein. Der Kontakt mit löslichen *Toxoplasma*-Proteinen induziert in Makrophagen und dendritischen Zellen die Sekretion von IL-12 (Reis e Sousa *et al.* 1997). Dieses Zytokin spielt einerseits eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunabwehr und induziert andererseits immunpathologische Effekte, die den Wirt schädigen.

Durch Inkubation von Makrophagen mit Toxoplasmen-Kulturüberständen wurde nachgewiesen, dass durch (ein) exkretorisch-sekretorische(s) *Toxoplasma*-Protein(e) die Produktion von IL-12 induziert wird (Grunvald *et al.* 1996). Zudem wurde gezeigt, dass attenuierte Toxoplasmen und ihre sekretorischen Produkte die IL-12-Produktion in geringerem Maße stimulieren als virulente (Schade u. Fischer 2001, Nischik *et al.* 2001). Ein denkbarer durch *dense granule* Proteine vermittelter Pathomechanismus könnte somit die Induktion der Produktion inflammatorischer Zytokine sein. Klärende Hinweise hierfür könnten *dense granule*-Deletionsmutanten liefern, an denen die Effekte verschiedener *dense granule* Proteine z.B. auf die Gewebeschädigung, die Zytokininduktion und die Immunpathologie untersucht werden könnten. In Mäusen wurde gezeigt, dass eine Infektion mit geringen

Parasitenzahlen eines virulenten Subtyp I-Isolates zu einer letalen Überproduktion von Typ1-Zytokinen führt. Im Gegensatz dazu induzierte eine Infektion mit einem Subtyp II-Isolat eine deutlich schwächere Typ1-Antwort und ein letaler Verlauf war erst nach Infektion mit sehr hohen Parasitenzahlen zu beobachten (Mordue *et al.* 2001).

Ein attenuiertes *T. gondii*-Isolat mit einer dauerhaft reduzierten Expression von Virulenzfaktoren und unbeeinträchtigter Immunogenität ist ein möglicher Kandidat für einen Lebendimpfstoff gegen Toxoplasmose. Vergleichende Untersuchungen, die mit identischen Impfstämmen oder Totimpfstoffen in verschiedenen Tierarten durchgeführt wurden, zeigten, dass die Ausprägung der erworbenen Immunität in starkem Maße von der Wirtsspezies abhängt und somit ein für eine Spezies entwickelter Impfstoff nicht uneingeschränkt auf andere Spezies übertragen werden kann. Wichtige Voraussetzungen für einen Lebendimpfstoff sind vor allem die Unschädlichkeit, d.h. die stabile Avirulenz und Nicht-Persistenz des Impfstammes innerhalb des Wirtsorganismus. Darüber hinaus sollte ein Impfstamm eine Kreuzimmunogenität mit möglichst vielen virulenten Erregerstämmen und Parasitenstadien besitzen und eine möglichst langanhaltende schutzvermittelnde zellulären und humorale Immunität induzieren. Bisher wurde trotz zahlreicher Erfolge mit Lebend- und Totvakzinen sowie Protein- und DNA-Impfstoffen noch kein Impfstoff entwickelt, der alle Voraussetzungen für die Vakzination von Menschen gegen Toxoplasmose erfüllt. Die Schlüsselrolle bei der Entwicklung eines solchen Impfstoffes spielt unabhängig von der Art des Vakzins die Induktion einer antigenspezifischen T- und B-Zell-Antwort.

5 GRA7 ist ein Virulenz-assoziiertes Antigen

Die vergleichenden Proteomanalysen attenuierter und virulenter Tachyzoiten haben eine Reduktion der Expression sekretorischer Proteine in den attenuierten Parasiten gezeigt. Die Veränderung im Expressionsniveau von GRA7 war dabei besonders auffällig. Alle *dense granule* Proteine werden von Tachyzoiten und Bradyzoiten gebildet und einige sind in Sporozoiten nachweisbar. In den enterischen Parasitenstadien wurden bisher nur GRA7 und NTPasen nachgewiesen. GRA7 scheint eine besondere Bedeutung für die intrazelluläre Entwicklung der Parasiten zu haben, da es als einziges *dense granule* Protein in allen infektiösen *T. gondii*-Stadien exprimiert wird (Ferguson *et al.* 1999^a, Tilley *et al.* 1997).

Ob der Verlust der Virulenz eine direkte Konsequenz der reduzierten GRA7-Expression ist, ist z.Z. noch nicht geklärt. Auch im Hinblick auf seine biochemischen Eigenschaften scheint GRA7 unter den *dense granule* Proteinen einzigartig zu sein. Alle bisher untersuchten *dense granule* Proteine (GRA2-GRA6) sind nach der Synthese als lösliche Proteine Membran-assoziiert und gelangen durch Exozytose in die PV (Mercier *et al.* 1998, Ossorio *et al.* 1994, Lecordier *et al.* 1999, Labruyere *et al.* 1999). GRA7 ist nach der Sekretion im tubulovesikulären Netzwerk und in der Membran der PV lokalisiert (Fischer *et al.* 1998, Jacobs *et al.* 1998, Bonhomme *et al.* 1998). Im Gegensatz zu den anderen Proteinen der GRA-Familie liegt GRA7 bereits innerhalb des Parasiten und auch nach der Sekretion membrangebunden vor (Stachelhaus 2001).

Ein- und zweidimensionale Western Blot-Analysen mit gegen verschiedene GRA7-Epitope gerichteten mAk haben bei attenuierten und virulenten Toxoplasmen hauptsächlich quantitative Unterschiede gezeigt (vgl. III.5.5). Die unterschiedlichen Signalintensitäten der Antigenbanden und -spots könnten aber auch einen Hinweis auf eine qualitativ veränderte Synthese des Proteins geben. So ist die Synthese unterschiedlicher GRA7-Isoformen durch

voneinander abweichende posttranslationale Modifikationen wie z.B. eine Glykosylierung denkbar. Andererseits könnte auch eine unterschiedliche Aktivität proteolytischer Enzyme in attenuierten und Wildtyp Toxoplasmen zu verschiedenen GRA7-Abbauprodukten führen, die von den mAk mit voneinander abweichender Affinität erkannt werden. Bei attenuierten *Theileria annulata* wurde eine Reduktion der Aktivität und Expression parasitinduzierter Matrix-Metalloproteinasen beschrieben. Durch Einbringen der Parasiten in einen Wirtsorganismus konnte das ursprüngliche Expressionsniveau der Enzyme nicht wieder hergestellt werden. Es wurden Veränderungen der Genexpression sowohl im Parasiten, als auch in den infizierten Wirtszellen festgestellt. (Hall *et al.* 1999). Für das *dense granule* Protein GRA4 wurden in mausvirulenten und avirulenten Toxoplasmen unterschiedliche Epitope identifiziert (Meisel *et al.* 1996).

Auch ein Einfluß der Immunreaktionen des Wirtsorganismus auf die Proteinexpression ist denkbar. Ein Protein, dessen Expressionsniveau ähnlich wie bei GRA7 mit der Virulenz korreliert, ist das Hitzeschockprotein HSP70. *In vivo* wird HSP70 von virulenten Toxoplasmen in größerer Menge produziert als von avirulenten Toxoplasmen. In der Zellkultur und in immunsupprimierten Mäusen stellen virulente Toxoplasmen die Produktion von HSP70 ein. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass HSP70-defiziente Tachyzoiten virulenter Isolate *in vivo* eine reduzierte Proliferation und *in vitro* eine erhöhte Konversionsrate in das Bradyzoitenstadium zeigen. In murinen Makrophagen induzierten diese Parasiten eine gesteigerte Expression der induzierbaren NO-Synthase und eine gesteigerte Produktion von NO. Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass die HSP70-Expression in virulenten Stämmen durch die Immunabwehr des Wirtsorganismus induziert wird, und dass die Parasiten durch HSP70 vor einer Schädigung durch die Abwehrmechanismen des Wirtes geschützt werden (Lyons u. Johnson 1998, Dobbin *et al.* 2002).

GRA7 ist das erste bisher bekannte *Toxoplasma*-Protein, das aus dem Parasiten heraus auf die Wirtszelloberfläche exportiert wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass der N-terminus des Proteins, der immunogene Proteinbereiche enthält, aus der Wirtszelle herausragt (Stachelhaus 2001). Ein Protein wie GRA7, das in allen Stadien aller Subtypen exprimiert wird und zudem von intrazellulären Toxoplasmen auf die Wirtszelloberfläche exportiert wird, ist ein optimales Zielantigen der Immunantwort. In der akuten Phase kommen Toxoplasmen nur in der sehr kurzen Zeit bis zur Infektion einer neuen Wirtszelle extrazellulär vor. In der chronischen Phase verbleiben die Parasiten intrazellulär und nur bei der sehr seltenen Ruptur der intrazellulären Zysten werden Antigene freigesetzt (Ferguson *et al.* 1989). Daher ist der Export von Proteinen ein möglicher Mechanismus, die Immunantwort des Wirtes dosiert zu stimulieren und somit ein stabiles Gleichgewicht in der Wirt-Parasit-Wechselbeziehung zu erhalten. Aufgrund seiner außergewöhnlichen biologischen und immunogenen Eigenschaften könnte GRA7 ein idealer Kandidat für die Entwicklung eines Impfstoffes und/oder eines diagnostischen Tests sein.

V. Zusammenfassung

Ein Ziel der Arbeitsgruppe ist die Identifizierung immundominanter Antigene von *Toxoplasma gondii*. Die Suche wurde auf sekretorische Proteine fokussiert, da diese in Tiermodellen der Toxoplasmose eine schützende Immunantwort induzieren. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers TxE2 war das 29 kDa Protein GRA7 identifiziert und als Bestandteil sekretorischer Organellen des Parasiten, der sogenannten *dense granules*, charakterisiert worden. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung der biologischen und immunologischen Eigenschaften des neuen Antigens.

Während der chronischen Phase der Infektion persistiert *T. gondii* im Gehirn des Zwischenwirts. Dort verhindern eingewanderte parasitenspezifische T-Lymphozyten eine Reaktivierung der in Zysten ruhenden Toxoplasmen. Welche parasitären Antigene diese T-Lymphozyten erkennen, ist weitgehend unbekannt. Aus dem Gehirn chronisch-infizierter Mäuse isolierte CD4-positive T-Zellen erkannten *Toxoplasma*-Lysat als Antigen und reagierten mit Proliferation und Sekretion von IFN- γ . Die Zellen reagierten nicht auf rekombinantes GRA7. Eine Funktion von GRA7 als T-Zell-Antigen bleibt somit unklar. Über den Nachweis GRA7-spezifischer Antikörper im Liquor chronisch infizierter Mäuse wurde GRA7 jedoch als Zielantigen der intrazerebralen B-Zell-Antwort identifiziert.

Die Primärstruktur von GRA7 umfasst 236 Aminosäuren und enthält ein N-terminales Signalpeptid sowie eine interne Transmembrandomäne. Zur näheren Analyse der Antigeneigenschaft des Proteins wurden GRA7-spezifische monoklonale Antikörper (mAk) generiert. Die Kartierung einzelner Antikörper-Epitope ergab, dass die mAk TxE2 und 5-241-178 eine Teilsequenz erkennen, die C-terminal an die Signalsequenz anschließt. Der mAk BATO214 erkennt eine weiter C-terminal gelegene Teilsequenz. Als antigener Bereich wurde somit das Segment zwischen Signalsequenz und Transmembrandomäne kartiert.

Durch kontinuierliche Passage in Zellkulturen wurden virulente Toxoplasmen im Verlauf dieser Arbeit attenuiert. Im Vergleich zum Wildtyp war bei den attenuierten Parasiten die für Mäuse sicher letale Infektionsdosis um den Faktor 1000 erhöht. Invasivität und Proliferation *in vitro* erschienen jedoch nicht beeinträchtigt: trotz ihrer verminderten Virulenz wuchsen die attenuierten Toxoplasmen schneller und lysierten ihre Wirtszellen früher als Wildtyp-Toxoplasmen, was als Adaption an die *in vitro* Bedingungen angesehen werden kann. Attenuierte Toxoplasmen enthielten selektiv *dense granule* Proteine in geringerer Konzentration als Wildtyp-Toxoplasmen. Insbesondere GRA7 wird von attenuierten Parasiten deutlich weniger synthetisiert. Die Korrelation zwischen dem Expressionsniveau einzelner GRA Proteine und der Virulenz deutet auf eine Rolle, die diese Proteine bei der Pathogenese möglicherweise spielen.

Die Kenntnis Virulenz-assoziiierter Proteine, ihrer Funktionen und ihrer Rolle in der Wirt-Parasit-Wechselbeziehung ist von Bedeutung für ein Verständnis der Pathomechanismen einer *Toxoplasma*-Infektion. Virulenz-assoziierte immundominante Antigene der Parasiten sind mögliche Angriffsziele bei der Entwicklung neuer Strategien zur Prävention, Diagnostik und Therapie der Toxoplasmose und zudem ideale Kandidaten für die Entwicklung neuer wirkungsvoller Vakzine.

VI. Literaturverzeichnis

Achbarou, A., Mercerau-Puijalon, O., Autheman, J.M., Fortier, B., Camus, D. and Dubremetz, J.F. 1991^a. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 103: 321-329.

Achbarou, A., Mercerau-Puijalon, O., Autheman, J.M., Fortier, B., Camus, D. and Dubremetz, J.F. 1991^b. Characterisation of miconeme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 47: 223-233.

Appleford, P.J. and Smith, J.E. 1997. *Toxoplasma gondii*: The growth characteristics of three virulent strains. *Acta Tropica* 65: 97-104.

Araujo, F.G., Hunter, C.A. and Remington, J.S. 1997. Treatment with interleukin 12 in combination with atovaquone or clindamycine significantly increases survival of mice with acute toxoplasmosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 188-190.

Arnold, S.J., Kinney, M.C., McCormick, M.S., Dummer, S. and Scott, M.A. 1997. Disseminated toxoplasmosis: Unusual presentations in the immunocompromised host. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 121: 896-973.

Asai, T., Miura, S., Sibley, L.D., Okabayashi, H. and Takeuchi, T. 1995. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 11391-11397.

Beller, D.I., Kieley, J.M. and Unanue, E.R. 1980. Regulation of macrophage populations I: Preferential inductions of Ia-rich peritoneal exsudates by immunologic stimuli. *Journal of Immunology* 124: 1426-1432.

Bommer, W. 1969. The life cycle of virulent *Toxoplasma* in cell cultures. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 47: 505-512.

Bona, C.A., Casares, S. and Brumeanu, T.D. 1998. Towards development of T-cell vaccines. *Immunology Today*. 19: 126-133.

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 immunolocalisation of a p29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 46: 1411-1421.

Boothroyd, J.C., Hehl, A., Knoll, L.J. and Manger, I.D. 1998. The surface of *Toxoplasma*: More and less. *International Journal for Parasitology* 28: 3-9.

Bourguin, I., Moser, A., Buzoni-Gatel, D., Tielemans, F., Bout, D., Urbain, J. and Leo, O. 1998. Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity *in vivo*. *Infection and Immunity* 66: 4867-4874.

Carruthers, V.B. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica* 81:111-122.

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

Cesbron-Delauw, M.F. and Capron, A. 1993. Excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: Their origin and role in the host-parasite interaction. *Research in Immunology* 144: 41-44.

Cesbron-Delauw, M.F. 1996. Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of Toxoplasmosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 219: 59-64.

Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodrigues, A., Hanson, P.I., Striepen, B., Roos, D.S. and Joiner, K.A. 1999. Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *Journal of Biological Chemistry* 274: 2424-2431.

- Connor, D.H., Chandler, F.W., Schwartz, D.A., Manz, H.J. and Lack, E.E.** 1997. Toxoplasmosis. In: Pathology of infectious diseases, Appleton & Lange, Stanford: 1261-1278.
- Contini, C., Fainardi, E., Cultrera, R., Canipari, R., Peyron, F., Delia, S., Paolino, E. and Granieri, E.** 1998. Advanced laboratory techniques for diagnosing *Toxoplasma gondii* encephalitis in AIDS patients: Significance of intrathecal production and comparison with PCR and ECL-western blotting. *Journal of Neuroimmunology* 92: 29-37.
- Cristina, N., Dardè, M.L., Boudin, C., Tavernier, G., Pestre-Alexandre, M. and Ambroise-Thomas, P.** 1995. A DNA fingerprinting method for individual characterisation of *Toxoplasma gondii* strains: Combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitology Research* 81: 32-37.
- Curriel, T.J., Krug, E.C., Purner, M.B., Pognard, P. and Berens, R.L.** 1993. Cloned human CD4⁺ cytotoxic T-lymphocytes specific for *Toxoplasma gondii* lyse tachyzoite-infected target cells. *Journal of Immunology* 151: 2024-2031.
- Dando, C., Gabriel, K.E., Remington, J.S. and Parmley, S.F.** 2001. Simple and efficient method for measuring anti-*Toxoplasma* immunoglobulin antibodies in human sera using complement-mediated lysis of transgenic tachyzoites expressing beta-galactosidase. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2122-2125.
- Darcy, F., Deslée, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V. and Capron, A.** 1988. Induction of a protective antibody-dependent response against Toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 10: 553-567.
- Darghouth, M.A., Miled, L.B., Bouattour, A., Melrose, T.R., Brown, C.G.D. and Kilani, M.** 1996. A preliminary study on the attenuation of tunisian schizont-infected cell lines of *Theileria annulata*. *Parasitology Research* 82: 647-655.
- Däubener, W. and Hadding, U.** 1997. Cellular immune reactions directed against *Toxoplasma gondii* with special emphasis on the central nervous system. *Medical Microbiology and Immunology* 185: 195-206.
- Denkers, E.Y.** 1999. T-lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection* 1: 699-708.
- De St. Groth, S.F. and Scheidegger, D.** 1980. Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *Journal of Immunological Methods* 35: 1-21.
- Djurković-Djavić, O., Nicoljić, T., Robert-Gangneux, F., Bobić, B. and Nicoljić, A.** 1999. Synergistic effect of clindamycin and atovaquone in acute murine toxoplasmosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2240-2244.
- Dobbin, C.A., Smith, N.C. and Johnson A.M.** 2002. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF- κ B. *Journal of Immunology* 169: 958-956.
- Dobrowolski, J.M. and Sibley, L.D.** 1996. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84: 933-939.
- Dobrowolski, J.M., Carruthers, V.B. and Sibley, L.D.** 1997. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology* 26: 163-173.
- Dubey, J.P. and Beattie, C.P.** 1988. Toxoplasmosis in man. In: Toxoplasmosis of animal and man. Boca Raton, FL, CRC Press: 41-53.
- Dubey, J.P.** 1998^a. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 28: 1019-1024.
- Dubey, J.P.** 1998^b. Toxoplasmosis. In: Topley & Wilson's microbiology and microbial infections 9th ed., Vol 5, (L. Collier, A. Balows and M. Sussman, Ed.): 303-318. Edward Arnold, London, UK.

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S. and Speer, C.A.** 1998^c. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 276-299.
- Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D. and Joiner, K.A.** 1993. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitology Research* 79: 402-408.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V. and Fourmaux, M.N.** 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal of Parasitology* 28: 1007-1113.
- Duquesne, V., Auriault, C., Darcy, F., Decavel, J.P., and Capron, A.** 1990. Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T-cells. *Infection and Immunity* 58: 2120-2126.
- Dytnerka, K.** 2002. Immunostimulatory proteins of *Toxoplasma gondii*. Dissertation Naturwissenschaftliche Fakultät Universität Lodz, Polen.
- Dzierszinski, 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. *Molecular Microbiology* 37: 574-582.
- Ferguson, D.J., Hutchison, W.M. and Pettersen, E.** 1989. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* 72: 599-603.
- Ferguson, D.J., Jacobs, D., Saman, E., Dubremetz, J.F. and Wright, S.E.** 1999^a. 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: 259-265.
- Ferguson, D.J.P., Cesbron-Delauw, M.F., Dubremetz, J.F., Sibley, L.D., Joiner, K.A. and Wright, S.E.** 1999^b. The expression and distribution of dense granule proteins in the enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Experimental Parasitology* 91: 203-211.
- Fischer, H.G., Stachelhaus, S., Sahm, M, Meyer, H.E. and Reichmann, G.** 1998. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* antigen released by infected host cells. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91: 251-262.
- Fischer, H.G., Reichmann, G. and Hadding, U.** 1996. *Toxoplasma* proteins recognized by protective T lymphocytes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 219: 175-181.
- Frank, R. and Döring, R.** 1988. Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid synthesis. *Tetrahedron* 44: 6031-6040.
- Freund, J. and McDermott, C.** 1942. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 49: 548-553.
- Gazzinelli, R.T., Hakim, F.T., Hieny, S., Shearer, G.M. and Sher, A.** 1991. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *Journal of Immunology* 146: 286-292.
- Gazzinelli, R.T., Hartley, J.W., Fredrickson, T.N., Chattopadhyay, S.K., Sher, A. and Morse, H.C.** 1992. Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency: Studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Infection and Immunity* 60: 4394-4401.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G. and Sheer, A.** 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T-cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF-alpha. *Journal of Immunology* 157: 798-805.
- Gonzales, G.** 1988. Biochromatography Symposium 2.-3.6.1988, Paris. (abstract).
- Grigg, M.E., Bonnefoy, S., Hehl, A.B., Suzuki, Y. and Boothroyd, J.** 2001. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 2001; 294: 161-5.

- Grunvald, E., Chiaramonte, M., Hieny, S., Wysocka, M., Trinchieri, G., Vogel, S.N., Gazzinelli, R.T. and Sher, A.** 1996. Biochemical characterisation and protein kinase C dependency of monokine-inducing activities of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 64: 2010-2018.
- Hall, R., Ilhan, T., Kirvar, E., Wilkie, G., Preston, P.M., Darghout, M., Sommerville, R. and Adamson, R.** 1999. Mechanism(s) of attenuation of *Theileria annulata* vaccine cell lines. *Tropical Medicine and International Health* 4: 78-84.
- Harlow, E. and Lane, D.** 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Henry, C., Marbrook, J., Vann, D.C., Kodlin, D. and Wofsy, C.** 1980. Limiting dilution analysis. In: *Selected methods in cellular immunology*. (Mishell B.B. & Shiigi S.M., Ed.), W.H. Freeman and Company, New York: 138-152.
- Hillenkamp, F., Unsoeld, E., Kaufmann, R. und Nietsche, R.** 1975. Laser microprobe mass analysis of organic materials. *Nature* 256: 119-120.
- Howe, D.K. and Sibley, L.D.** 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases* 172: 1561-1566.
- Hunter, C.A. and Remington, J.S.** 1994. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *Journal of Infectious Diseases* 170: 1057-1067.
- 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*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91: 237-249.
- Jacobs, D., Vercammen, M. and Saman, E.** 1999. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 24-29.
- Janeway, C.A. and Travers, P.** 1997. Die Struktur des Antikörpermoleküls und der Immunglobulin-gene. In: *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 115-122.
- Jones, J.L., Hanson, D.L., Dworkin, M.S., Alderton, D.L., Fleming, P.L., Kaplan, J.E. and Ward J.W.** 1999. Surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses 1992-1997. In: *Centers for Disease Control and Prevention Surveillance Summaries, Morbidity and Mortality Weekly Report* 48: 1-22.
- Karasuyama, H. and Melchers, F.** 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2,3,4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *European Journal of Immunology* 18: 97-104.
- Kaye, J., Gillis, S., Mizel, S.B., Shevach, E.M., Malek, T.R., Dinarello, C.A., Lachman, L.B. and Janeway, C.A.** 1984. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. *Journal of Immunology* 133: 1339-1345.
- Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10: 203-209.
- Köhler, G. and Milstein, C.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C. and Sibley, L.D.** 1999. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 102: 311-324.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L.D. and Cesbron-Delauw, M.F.** 1999. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Molecular Biology of the Cell* 10: 1277-1287.
- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L.D. and Cesbron-Delauw, M.F.** 1999. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Molecular Biology of the Cell* 10: 1277-1287.
- Goebel, S., Gross, U. and Luder, C.G.** 2001. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *Journal of Cell Science* 114: 3495-3505.
- Leriche, M.A. and Dubremetz, J.F.** 1991. Characterisation of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology* 45: 249-260.
- Liesenfeld, O.** 1999. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology* 201: 229-239.
- Lucius, R. and Loos-Frank, B.** 1997. Alveolata. In: *Parasitologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg: 66-125.
- Lyons, R.E. and Johnson, A.M.** 1998. Gene sequence and transcription differences in 70 kDa heat shock protein correlate with murine virulence of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 28: 1041-1051.
- McFadden, G.I. and Roos, D.S.** 1999. Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends in Microbiology* 7: 328-332.
- Mehlhorn, H., Eichenlaub, D., Löscher, T. and Peters, W.** 1995. Diagnostik und Therapie der Parasitosen des Menschen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 147-153.
- Meisel, R., Stachelhaus, S., Mévélec, M.N., Reichmann, G., Dubremetz, J.F. and Fischer, H.G.** 1996. Identification of two alleles in the GRA4 locus of *Toxoplasma gondii* determining a differential epitope which allows discrimination of type I versus type II and II strains. *Molecular and Biochemical Parasitology* 81: 472-479.
- Modugil, K.D., Sercarz, E.E. and Grewal, I.S.** 1998. Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues. *Immunology Today* 19: 217-220.
- Meisel, R.** 1998. *Toxoplasma gondii*-spezifische monoklonale Antikörper: Werkzeuge zur Reinigung nativer, potentiell T-Zell-stimulatorischer *Toxoplasma*-Antigene. Dissertation Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.F. and Sibley, L.D.** 1998. The amphipathic alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate postsecretory membrane association. *Journal of Cell Science* 111: 2171-2180.
- Mercier, C., Howe, D.K., Mordue, D., Lingnau, M. and Sibley, L.D.** 1998. Targeted disruption of the GRA2 Locus in *Toxoplasma gondii* decrease acute virulence in mice. *Infection and Immunity* 66: 4176-4182.
- Metsis, A., Pettersen, E. and Petersen, E.** 1995. *Toxoplasma gondii*: Characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 kDa with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. *Experimental Parasitology* 81: 472-479.
- Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M. and Sibley, L.D.** 1999^a. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *Journal of Experimental Medicine* 190: 1783-1792.
- Mordue D.G., Håkansson, S., Niesman, I. And Sibley, L.D.** 1999^b. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental Parasitology* 92: 87-99.

- 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. *Journal of Immunology* 167: 4547-4584.
- Morissette, N.S. and Sibley, L.D.** 2002. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 21-38.
- Moudgil, K.D., Sercarz, E.E. and Grewal, I.S.** 1998. Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues. *Immunology Today* 19: 217-220.
- Mutschler, E.** 1996. *Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart: 651-739.
- Nakaar, V., Samuel, B.U., Ngo, E.O., and Joiner, K.A.** 1999. Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 274: 5083-5087.
- Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clark, P., Duke, R.C., and Curiel, T.J.** 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *Journal of Immunology* 160: 1824-1830.
- 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 and Infection* 4: 581-590.
- Nicolle, C. and Manceaux, L.** 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes Rendus de l'Academie des Science Paris* 147 : 763-766.
- Nielsen, H.V., Lauemøller, S.L., Christianse, L., Buus, S., Fomsgaard, A. and Petersen, E.** 1999. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 Gene. *Infection and Immunity* 67: 6358-6363.
- 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 and Infection*: 3, 1-11.
- Ossorio, P.N., Dubremetz, J.F. and Joiner, K.A.** 1994. A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *Journal of Biological Chemistry* 269: 15350-15357.
- Pettersen, E.K.** 1977. Experimental toxoplasmosis in mice and rabbits. *Acta pathologica microbiologica scandinavica* 85: 95-102.
- Petersen, E., Nielsen, H.V., Christiansen, L. and Spenter, J.** 1998. Immunisation with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 16: 1283-1289.
- Pfefferkorn, E.R. and Pfefferkorn, L.C.** 1976. *Toxoplasma gondii*: Isolation and preliminary characterisation of temperature-sensitive mutants. *Experimental Parasitology* 39: 365-367.
- Pfefferkorn, E.R. and Pfefferkorn, L.C.** 1977. Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *Journal of Protozoology* 24: 449-453.
- Porter, S.B. and Sande, M.** 1992. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine* 327: 1643-1648.
- Prigione, I., Facchetti, P., Lecordier, L., Deslée, D., Chiesa, S., Cesbron-Delauw, M.F. and Pistoia, V.** 2000. T-cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: Characterisation of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *Journal of Immunology* 164: 3741-3748.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. and Lunnardi, J.** 1997. Improvement of the solubilisation of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18: 307-316.
- Rehm, H.** 1997. In: *Der Experimentator: Proteinbiochemie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 6-12.

- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Janovic, D., Charest, H. 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. *Journal of Experimental Medicine* 186:1819-1829.
- 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. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119:43-54.
- Remington, J.S., McLeod, R. and Desmonts, G.** 1995. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. (Remington J.S. & Klein J.O., Ed.), W.B. Saunders Company, Philadelphia: 120-213.
- Roberts, F. and McLeod R.** 1999. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitology Today* 15: 51-57.
- Roos, D.S., Crawford, M.J., Donald, R.G.K., Kissinger, J.C., Klinczak, L. and Striepen, B.** 1999. Origin, targeting and function of the apicomplexan plastid. *Current Opinion in Microbiology* 2: 1026-1033.
- Rosenblatt, J.E.** 1999. Antiparasitic Agents. *Mayo Clinic Proceedings* 74: 1161-1175.
- Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B. and Dubremetz, J.F.** 1988. Characterisation of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 29: 203.
- 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: 229-246.
- Sayles, P.C., Gibson, G.W. and Johnson, L.L.** 2000. B-cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 68: 1026-1033.
- Schade, B. and Fischer, H.G.** 2001. *Toxoplasma gondii* induction of interleukin-12 is associated with acute virulence in mice and depends on the host genotype. *Journal of Veterinary Parasitology* 100: 63-74.
- Schlüter, D., Löhler, J., Deckert, M., Hof, H. and Schwendemann, G.** 1991. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of toxoplasma antigens, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. *Journal of Neuroimmunology* 31: 185-189.
- Schluter, D., Meyer, T., Kwok, L.Y., Montesinos-Rongen, M., Lutjen, S., Strack, A., Schmitz, M.L. and Deckert, M.** 2002. Phenotype and regulation of persistent intracerebral T-cells in murine *Toxoplasma*-Encephalitis. *Journal of Immunology* 169: 315-322.
- Schmitt, K., Däubener, W., Bitter-Suermann, D. und Hadding, U.** 1988. A save and efficient method for elimination of cell culture mycoplasma using ciprofloxacin. *Journal of Immunological Methods* 109: 17-25.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J.M. and Joiner, K.A.** 1994. The parasitophorus vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 509-513.
- Sibley, L.D.** 1995. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Cellular Biology* 103: 867-874.
- Sibley, L.D. and Boothroyd, J.C.** 1992. Virulent strains of *T. gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359: 82-85.
- Sibley, L.D., Mordue, D. and Howe, D.K.** 1999. Experimental approaches to understand virulence in *Toxoplasmosis*. *Immunobiology* 201: 210-224.
- Silverman, J.A., Qi, H., Riehl, A., Beckers, C., Nakaar, V. and Joiner, K.A.** 1998. Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 12352-12359.

- Simon, C and Stille, W.** 2000. In: Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis. Schattauer Verlagsgesellschaft: 222-237.
- Somerville, R.P.T., Littlebury, P., Pipano, E., Brown, C.G.D., Shkap, V., Adamson, R.E., Oliver, R.A., Glass, E.J. and Hall, F.R.** 1998. Phenotypic and genotypic alterations associated with the attenuation of a *Theileria annulata* vaccine cell line from Turkey. *Vaccine* 16: 569-575.
- Stachelhaus, S.** 1996. Identifizierung exkretorischer *Toxoplasma gondii*-Antigene in infizierten Hirnzellkulturen mit monoklonalen Antikörpern und T_H-Zellen. Diplomarbeit Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Stachelhaus, S.** 2001. Charakterisierung und Identifizierung eines 29 kDa Proteins von *Toxoplasma gondii* – Bedeutung bei der Wirt-Parasit-Wechselbeziehung. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 8413-8418.
- Suzuki, Y.** 1999. Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology* 201: 255-271.
- Suzuki, Y., Conley, F.K., Remington, J.S.** 1989. Differences in the virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Infectious Diseases* 159: 790-794.
- Tilley, M., Fichera, M.E., Jerome, M.E., Roos, D.S and White, M.W.** 1997. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense granule proteins. *Infection and Immunity* 65: 4598-4605.
- Velge-Roussel, F., Chardès, T., Mévélec, P., Brillard, M., Hoebeke, J. and Bout, D.** 1994. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66: 31-38.
- Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., DeBraekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E. and Verschuere, H.** 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infection and Immunity* 68: 38-45.
- Winsor, J., Verlinde, J.D., Van Thiel, P.H., Davel, J. and Van der Elst, P.** 1948. Isolation of toxoplasma from cerebrospinal fluid of a living infant in holland. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 67: 292.
- Yano, K. and Nakabayashi, T.** 1986. Attenuation of the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* by passages in mice immunized with *Toxoplasma* lysate antigens. *Biken Journal* 29: 31-37.
- Yap, G.S. and Sher, A.** 1999. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: Initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201: 240-247.

VII. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrom</i>
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Bequerel
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
cDNA	komplementäre DNA
ConA	Concanavalin A
cpm	<i>counts per minute</i>
d	Tag
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESA	<i>excreted/secreted antigen(s)</i>
Fc	konstante, nicht Antigen bindende Region eines Antikörpers
FCS	fetales Kälberserum
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GRA	<i>T. gondii dense granule antigen</i>
Gy	Gray
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSP	Hitzeschock-Protein
HT	Hypoxanthin, Thymidin
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
I.E.	internationale Einheiten
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>matrix-assisted laser-desorption ionisation</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>T. gondii</i> Mikronemenprotein
NK	<i>natural killer cells</i>

NOS	Stickoxid-Synthase
NTPase	Nukleosidtriphosphat-Hydrolase
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PV	parasitophore Vakuole
PVM	Membran der PV
r	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	<i>T. gondii</i> Rhoptrienprotein
RT	Raumtemperatur
SAG	<i>T. gondii surface antigen</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPF	<i>specific-pathogen-free</i>
<i>T.</i>	<i>Toxoplasma</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	<i>Toxoplasma</i> -Enzephalitis
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th	T-Helfer-Lymphozyt
TLA	<i>Toxoplasma</i> -Lysat-Antigen
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit
ZNS	Zentralnervensystem

VIII. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Abb. 2:	Ultrastruktur eines Tachyzoiten	7
Tab. 1:	<i>Toxoplasma gondii</i> -spezifische Antikörper	21
Abb. 3:	Prinzip der Elektroelution	31
Abb. 4:	Aktivierung CD4-positiver Gehirn-T-Zellen durch APC und TLA.....	42
Abb. 5:	Nachweis GRA7-spezifischer Antikörper im Liquor chronisch-infizierter Mäuse	43
Abb. 6:	Vergleich des GRA7- und SAG1-Gehaltes in TLA und TFL.....	44
Abb. 7:	Kontrolle der Spezifität der immunoaffinitätschromatographischen Reinigung von GRA7.....	45
Abb. 8:	Kontrolle der Elutionseffizienz	46
Abb. 9:	Gehalt an GRA7 und Gesamtantigenen in Elektroeluatens aus gefärbten und ungefärbten SDS-Polyacrylamidgelen	48
Abb. 10:	Rechromatogramm der 29 kDa Elektroeluate	49
Abb. 11:	Anti- <i>Toxoplasma</i> -Reaktivität des Serums der mit GRA7 immunisierten Maus.....	50
Abb. 12:	<i>Toxoplasma</i> - und GRA7-spezifische Reaktivität des Immunserums.....	51
Abb. 13:	Molekulargewichte der von den monoklonalen Antikörpern erkannten <i>Toxoplasma gondii</i> -Proteine	52
Tab. 2:	GRA7-spezifische monoklonale Antikörper: Isotypen und Reaktivität gegenüber TLA und rekombinatem GRA7	54
Abb. 14:	Überlappende GRA7-Peptide.....	55
Abb. 15:	Epitopsequenzen GRA7-spezifischer monoklonaler Antikörper	56
Abb. 16:	Positionen epitoptragender GRA7-Proteinsequenzen nach zweidimensionaler Auftrennung von TLA	58
Abb. 17:	Letalität von Mäusen nach Infektion mit <i>in vivo</i> oder <i>in vitro</i> passagierten Toxoplasmen	60
Abb. 18:	Intrazelluläre Proliferation mausvirulenter und <i>in vitro</i> attenuierter Tachyzoiten des Isolates BK in L929-Fibroblasten	62
Tab. 3:	Wirtszellinvasion und intrazelluläre Vermehrung von aBK und vBK Tachyzoiten	63
Abb. 19:	Intrazelluläre Vermehrung von virulenten und attenuierten Tachyzoiten des Isolates BK	64
Abb. 20:	Eindimensionale SDS-PAGE von TLA aus aBK und vBK Toxoplasmen	65
Abb. 21:	Zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung von TLA aus virulenten und attenuierten Toxoplasmen	66
Abb. 22:	Antigengehalt von Lysaten aus aBK und vBK Toxoplasmen.....	67
Abb. 23:	Antigenmuster von aBK und vBK Tachyzoiten im eindimensionalen Western Blot	69
Abb. 24:	GRA7-Antigenmuster in zweidimensional aufgetrennten Lysaten aus aBK und vBK	70
Abb. 25:	Antigene Bereiche der GRA7-Primärstruktur	74

IX. Dank

Herrn Professor Dr. Ulrich Hadding danke ich für seine persönliche Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Hans-Georg Fischer danke ich für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die persönliche Betreuung dieser Arbeit sowie für die Hilfestellungen und Ratschläge in zahlreichen anregenden Diskussionen. Ganz besonders herzlich danke ich für das Verständnis und das Vertrauen und nicht zuletzt für die gute Zusammenarbeit.

Frau Professor Dr. Helga Idel danke ich für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten.

Ich danke **allen Mitarbeitern** des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität von denen jeder dazu beigetragen hat, dass ich gerne dort gearbeitet habe. Ich bedanke mich für die beständige Hilfsbereitschaft und das außerordentlich gute Arbeitsklima im alltäglichen Laborbetrieb. Besonders herzlich möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fischer bedanken, die mich stets mit Rat und Tat unterstützt haben: **Ursula Bonifas, Karin Buchholz, Henryka Dlugonska, Katarzyna Dytnerska, Ruth Dörfler, Bernd Nitzgen, Stefan Stachelhaus, Gaby Reichmann** und **Bartholomäus Schade**.

Herrn Dr. Karl Köhrer und **Frau Dr. Sabine Metzger** danke ich für die zuverlässigen Sequenzanalysen.

Ronald Buchholz danke ich sehr herzlich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Meiner Mutter, Marc Schiffer und **meinen Freunden** danke ich für die Unterstützung und das Verständnis, insbesondere in den Momenten, in denen meine Kraft und Geduld verbraucht waren. **Meiner Freundin Uta** danke ich ganz besonders dafür, dass sie stets an mich geglaubt hat und immer für mich da war.

X. Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher noch von keiner medizinischen Fakultät abgelehnt. Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen Eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, dass die Fakultät die Promotion widerruft.

Düsseldorf, 02.01.2003

Curriculum Vitae

Nicole Nischik

geboren am 31.08.1970 in Grevenbroich
ledig, katholisch, deutsche Staatsangehörigkeit

Schul- und Berufsausbildung

08/1977 – 07/1981	Grundschule in Grevenbroich und Bergheim
08/1981 – 05/1990	Gutenberggymnasium in Bergheim Abschluss: Abitur (2,5)
04/1991 – 03/1993	Ausbildung zur Medizinisch-technischen Assistentin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Abschluss: Examen (2,3)

Studium

10/1993 - 05/2002	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03/1996	Physikum („befriedigend“)
03/1997	1. Staatsexamen („befriedigend“)
03/2001	2. Staatsexamen („gut“)
05/2002	3. Staatsexamen („sehr gut“)

Praktisches Jahr

04/2001 – 03/2002	Praktisches Jahr im Hospital zum Hl. Geist in Kempen
04/2001 – 08/2001	Prof. Dr. W. Wildmeister, Abteilung für Innere Medizin
08/2001 – 12/2001	Prof. Dr. A. Kaschner, Abteilung für Chirurgie
12/2001 – 03/2002	Dr. M. Stahnke, Abteilung für Anästhesie

Tätigkeiten

06/1990 – 03/1991	Zustellerin bei der Deutschen Bundespost in Grevenbroich
03/1992 – 08/1992	Arbeit im elterlichen Einzelhandelsbetrieb in Pulheim
08/1993 – 12/1993	Medizinisch-technische Assistentin in der Abteilung für Gastroenterologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/2002 – 09/2003	Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Pneumologie, Aller- gologie und Somnologie, Krankenhaus Bethanien in Moers
ab 11/2003	Ärztin im Praktikum am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, 28.10.2003