

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Abwehrmechanismen in murinen Astrozyten gegen
Toxoplasma gondii:
Die Interferon- γ induzierten 47 kDa GTPasen
IIGP und TGTP

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Felix Philip Lubitz

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer
Koreferent: Prof. Dr. Bernd C. Kieseier

I Einleitung	5
1 Biologie von <i>Toxoplasma gondii</i>	5
1.1 Vermehrungszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i>	6
1.2 Invasion in die Wirtszelle und intrazelluläre Entwicklung	9
1.2.1 Rolle der Rhoptrien bei der Entstehung der parasitophoren Vakuole ...	12
1.3 Virulenz von <i>Toxoplasma gondii</i> in der Maus	14
1.3.1 ROP18, ein neuer Virulenzfaktor?	16
2 Immunabwehr gegen <i>Toxoplasma gondii</i>	17
2.1 Interferon- γ induzierte Abwehrmechanismen	19
3 Fragestellung der Arbeit	23
II Material	25
1. Chemikalien	25
2 Medien und Puffer	26
3 Antibiotika	28
4 Proteine	28
4.1 Antikörper	28
4.2 Restriktionsenzyme	30
4.3 Sonstige Enzyme	30
4.4 Zytokine	30
5 Nukleinsäuren	30
5.1 Vektoren	31
5.2 Oligonukleotide	31
5.3 Nukleotide	31
6 Organismen	32
6.1 Bakterien	32
6.2 Zelllinien	32
6.3 Toxoplasmen	32
6.4 Mäuse	32
7 Laborbedarf	33
7.1 Kits	33
8 Geräte	34
9 Software	34
III Methoden	36
1 Zellkultur	36

1.1 Kultur von Zelllinien	36
1.1.1 L929 Fibroblasten	36
1.1.2 HS27 Fibroblasten	36
1.2 Präparation und Kultur von murinen primären Gliazellen	37
1.2.1 Präparation von Gliazellen aus neonatalen Mäusen.....	37
1.2.2 CD11b ⁺ Mikroglia Depletion	38
1.3 Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i>	39
1.3.1 Virulente Toxoplasmen	39
1.3.2 Avirulente Toxoplasmen.....	39
1.3.3 Transfizierte Toxoplasmen.....	39
1.3.4 Einfrieren und Auftauen von Toxoplasmen	40
2 Toxoplasmen-Proliferationstests	40
3 Immunfluoreszenz	41
3.1 Präparate	41
3.2 Immunfärbung.....	41
3.3 Mikroskopische Auswertung der Präparate	42
4 Herstellung ROP18 transfizierter Toxoplasmen	42
4.1 Präparation genomischer DNA aus Toxoplasmen.....	42
4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
4.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten (Agarose Gelelektrophorese)	44
4.4 Isolation und Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel.....	44
4.5 Restriktionsverdau	45
4.5.1 Restriktionsverdau zur Kontrolle der Vektorkonstrukte	45
4.5.2 Restriktionsverdau für Ligationszwecke	46
4.6 Ligation	46
4.6.1 Ligation mittels TOPO-TA-Cloning Kit.....	46
4.6.2 Ligation mittels T4 Ligase	46
4.7 Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien.....	47
4.7.1 Haltung und Sicherung von Bakterienstämmen	47
4.8 Anzucht von Übernachtskulturen.....	48
4.9 Gewinnung von Plasmid-DNA	48
4.9.1 Fällung von DNA	48
4.9.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	48
4.10 Sequenzierung von DNA	49

4.11 Transfektion von Toxoplasmen	49
4.11.1 Transfektion mittels Elektroporation	50
4.12 Kontrolle der Transfektionsrate - Nachweis des Vektors	50
4.12.1 Immunfluoreszenzanalyse (IFA)	50
4.12.2 Western Blot	51
4.12.2.1 Präparation von Toxoplasmenlysat.....	51
4.12.3.2 Auftrennen von Proteinen mittels SDS-PAGE	51
4.12.3.3 Semi-dry-Transfer	51
4.12.3.4 Immundetektion.....	52
4.13 Monoklonierung tranfizierter Toxoplasmen	52
IV Ergebnisse.....	53
1 Interferon- γ stimulierte Astrozyten hemmen <i>Toxoplasma gondii</i>	53
1.1 Hemmung virulenter Toxoplasmen	53
1.2 Hemmung avirulenter Toxoplasmen	54
2 Herstellung ROP18 transfizierter <i>Toxoplasma gondii</i>	56
2.1 Isolierung der ROP18 Sequenz aus virulenten BK Toxoplasmen.....	56
2.2 Amplifikation / Klonierung in pCRII TOPO Vektor	56
2.3 Klonierung in pTub+c-myc Vektor	58
2.4 Transfektion von ME49 Toxoplasmen mit pTub+ROP18 ^{BK} +c-myc.....	59
2.5 Monoklonierung der ME49 (ROP18 ^{BK}) Toxoplasmen	60
2.5.1 Nachweis der c-myc Expression in monoklonalen ME49 (ROP18 ^{BK}) Toxoplasmen	61
3 p47 GTPasen Expression in <i>Toxoplasma gondii</i> infizierten Astrozyten.....	63
3.1 Kinetik der IIGP Rekrutierung an die PV virulenter und avirulenter Toxoplasmen.....	63
3.2 IIGP Rekrutierung an die PV in einer Mischinfektion mit avirulenten und virulenten Toxoplasmen	66
3.3 Kinetik der IIGP Rekrutierung an die PV bei ME49 (ROP18 ^{BK}) Toxoplasmen	70
3.4 Kinetik der TGTP Rekrutierung an die PV virulenter und avirulenter Toxoplasmen.....	71
3.5 Kinetik der TGTP Rekrutierung an die PV bei ME49 (ROP18 ^{BK}) Toxoplasmen.....	73

3.6 Kinetik der TGTP und IIGP Rekrutierung an die parasitophore Vakuole avirulenter Toxoplasmen in einer Kofärbung	74
3.7 Zusammenhang der p47 GTPasen Akkumulation an der parasitophoren Vakuole und GRA7	77
4 Anzahl der Toxoplasmen in einer parasitophoren Vakuole nach 24 Stunden.....	78
V Diskussion.....	81
1 Interferon- γ abhängige Hemmung der Proliferation virulenter und avirulenter Toxoplasmen	81
2 Die Rekrutierung der p47 GTPasen an die parasitophore Vakuole virulenter und avirulenter Toxoplasmen	82
3 Manipulation der parasitophoren Vakuole durch virulente Toxoplasmen.....	83
4 Die p47 GTPasen	84
4.1 Kinetik der IIGP und TGTP Rekrutierung an die parasitophore Vakuole.....	84
4.2 Lokalisation von IIGP und TGTP an die parasitophore Vakuole	86
4.3 GRA7 und die p47 GTPasen IIGP und TGTP	86
5 ROP18 und die p47 GTPasen IIGP und TGTP	87
VI Zusammenfassung	91
VII Literaturverzeichnis.....	93
VIII Anhang	103
1 Abkürzungsverzeichnis	103
2 Danksagung	107
3 Eidesstattliche Erklärung	108
4 Lebenslauf	109

I Einleitung

1 Biologie von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) wurde erstmals 1908 von C. Nicolle und L. Manceaux im Pasteur Institut von Charles Nicolle in Tunis beschrieben. Entdeckt wurde der obligat intrazelluläre Parasit in dem nordafrikanischen Wüstennagetier *Ctenodactylus gundi*. Der Name setzt sich zum einen aus der Morphologie (*tox*o = bogen, *plasma* = Leben) zum anderen aus dem Wirtsnamen zusammen. Nicolle und Manceaux hatten den Wirt fälschlicher Weise als *Ctenodactylus gundi* identifiziert (Weiss, 2007).

Taxonomisch teilt man *T. gondii* in die Gattung *Toxoplasma*, Subklasse *Coccidia* und Stamm *Apicomplexa* ein (Mehlhorn und Walldorf, 1988). Zum Stamm der *Apicomplexa* zählen des Weiteren die humanpathogenen Parasiten *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria, und *Cryptosporidium parvum*, Erreger der Kryptosporidiose. Gemeinsam ist allen Vertretern dieses Stammes der sogenannte Apikalkomplex, der auch namensgebend ist. Dieser Apikalkomplex besteht aus Zytoskelettelementen (Conoid) sowie sekretorischen Organellen (Rhoptrien, Mikronemen und Ddense Granula), welche bei der Wirtszellinvasion eine entscheidende Rolle spielen (Dubey et al., 1998; Dubremetz und Schwartzman, 1993).

Im Gegensatz zu vielen anderen Mitgliedern des Stammes der *Apicomplexa* zeigt *T. gondii* nahezu keine Wirtszellspezifität. Der Parasit ist in der Lage in alle Zelltypen, von Säugetieren über Fische bis hin zu Insektenzellen, einzudringen (Lebrun, 2007).

T. gondii ist der Erreger der Toxoplasmose. Mit einem Durchseuchungsgrad von bis zu 30% der Weltbevölkerung gehört die chronische Infektion mit *T. gondii* zu einer der häufigsten Krankheiten (Jackson und Hutchison, 1989). Allein in den USA gehört die Toxoplasmose bei den durch Lebensmittel übertragenen Erregern zu der dritt-häufigsten Todesursache (Mead et al., 1999). Die Durchseuchung steigt mit zunehmendem Lebensalter an und variiert stark von Land zu Land. Es gibt zwei mögliche Infektionswege, zum einen über unzureichend gekochtes bzw. rohes Fleisch, zum anderen über den Kontakt mit Katzenkot (Montoya und Liesenfeld, 2004). Bei Immunkompetenten läuft die Infektion meistens symptomlos ab, es können jedoch auch grippeähnliche Symptome auftreten, die für einige Wochen bis Monate anhalten. Hingegen kann die Toxoplasmose bei Immunsupprimierten, wie z.B. AIDS- oder organtransplantierten Patienten, zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen. Diese akute, reaktivierte Toxoplasmose entsteht durch die Ruptur von Zysten im Auge, in der Lunge oder im Zentralnervensystem (ZNS). Eine der schwerwiegendsten Komplikation stellt die durch Toxoplasmen bedingte Enzephalitis dar, wovon bis zu 40 % der AIDS Patienten betroffen

sind (Kasper und Buzoni-Gatel, 1998). Neben den bereits beschriebenen Infektionswegen ist ferner eine Übertragung des Parasiten von der Mutter auf das ungeborene Kind möglich (kongenitale Übertragung), was zu Hydrozephalus, Chorioretinitis, intrakraniellen Verkalkungen und psychomotorischer Retardierung beim Kind führen kann, insbesondere wenn die Infektion der Mutter mit *T. gondii* im letzten Trimenon (7-9 Schwangerschaftsmonat) erfolgt. Die so übertragende konnatale Toxoplasmose ist eine meldepflichtige Erkrankung.

1.1 Vermehrungszyklus von *Toxoplasma gondii*

T. gondii ist in der Lage, sich sowohl sexuell in seinem Endwirt (Katze) als auch asexuell in Zwischenwirten (z.B. Säugetiere) zu vermehren. Hierfür werden drei Stadien des Parasiten unterschieden: Sporoziten, Tachyzoiten und Bradyzoiten (Dubey, 1998). Alle drei Formen sind unterschiedlich infektiös und repräsentieren verschiedene Stadien des Lebenszyklus des Parasiten. Die geschlechtliche Vermehrung findet nur in der intestinalen Phase in einem katzenartigen Tier (Felidae) statt. Hierbei wird ein mit *T. gondii* infizierter Zwischenwirt (z.B. Maus) von einer Katze gefressen. Der Parasit wird daraufhin in Form von Gewebezysten (Bradyzoiten) aus Muskel, Gehirn oder Auge des Zwischenwirtes aufgenommen. Durch proteolytische Enzyme des Verdauungstraktes (z.B. Pepsin) löst sich die Hülle der Gewebezysten auf und die darin enthaltenen Bradyzoiten werden im Dünndarm der Katze freigesetzt, bleiben dabei allerdings selbst unbeschädigt. Die freigewordenen Bradyzoiten dringen in die Epithelzellen des Dünndarms ein und teilen sich dort zunächst für einige Generationen asexuell (spezielle Form der Schizogonie), beschrieben als Typ A bis E Schizonten (Dubey und Frenkel, 1972). Zwei Tage nach der oralen Aufnahme der Gewebezysten beginnt der sexuelle Vermehrungszyklus mit der Bildung von Gameten aus Schizonten Typ D und E. So findet man drei bis fünfzehn Tage nach oraler Aufnahme im gesamten Dünndarm (besonders gehäuft im Ileum) weibliche Makrogameten und männliche Mikrogameten. Diese fusionieren miteinander und bilden das einzige diploide Stadium von *T. gondii*, die Oozyste. Diese Oozyste besitzt eine feste, fünfflagige Zystenwand und wird nach Ruptur der Dünndarm-Epithelzellen mit dem Faeces der Katze ausgeschieden. Nach ein bis fünf Tagen im Freien beginnt die Sporulation mit meiotischer Reduktionsteilung, wobei in der Oozyste zwei Sporozysten mit je vier Sporoziten entstehen. Die sporulierte Oozyste ist hochinfektiös, zeichnet sich durch außerordentliche Widerstandskräfte gegenüber äußerer Witterung aus und kann auch nach Monaten bis Jahren noch infektiös sein (Frenkel, 1973).

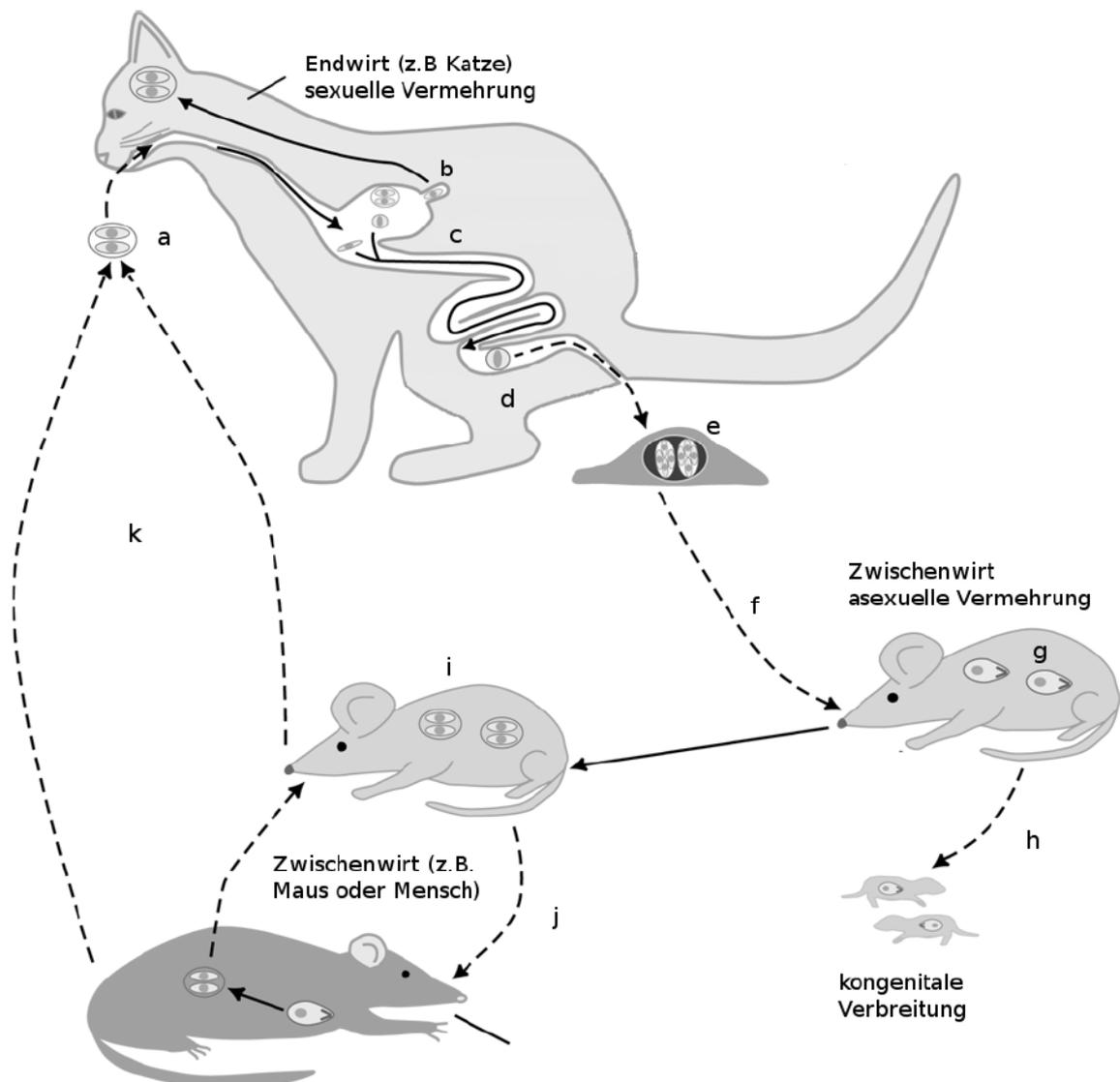


Abb. 1: Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Die sexuelle Vermehrung von *T.gondii* findet ausschließlich im Endwirt (*Felidae*) statt. Hierzu nimmt z.B. die Katze Gewebezysten auf (a), aus denen im Verdauungstrakt Bradyzoiten freigesetzt werden (b). Diese differenzieren dann zu Mikro- und Makrogameten (c) und fusionieren zur Oozyste (d). Nach Ausscheidung der Oozyste beginnt die Sporulation mit meiotischer Reduktionsteilung (e). Die infektiösen Sporozoitien werden durch einen Zwischenwirt aufgenommen und konvergieren von Tachyzoiten (g) in der akuten Phase zu Bradyzoiten (i) in der chronischen Phase. Während der akuten Phase kann es zu einer kongenitalen Übertragung durch Tachyzoiten auf den Fötus kommen. Die enzystierten Bradyzoiten werden wiederum durch Fleischverzehr von einem Zwischen- oder Endwirt aufgenommen. Gestrichelte Linien stellen Verbreitungswege, durchgezogene Linien stellen Differenzierungsschritte dar (verändert nach (Ajioka et al., 2001)).

Die Sporozoitien können nun durch einen Zwischenwirt (z.B. Mensch, Nagetier) oral aufgenommen werden. Sie dringen zunächst in das Darmepithel ein, wo sie sich zu Tachyzoiten, der sich schnell teilenden Form, umwandeln. Tachyzoiten verteilen sich, ausgehend vom Darm, über das Blut, die Lymphe und das Gewebe im gesamten Organismus und sind in der Lage, aktiv in Zellen verschiedenster Gewebe einzudringen. In der Wirtszelle ist der Parasit umgeben von einer parasitophoren Vakuole (PV), die zum Großteil aus Teilen der Wirtszellmembran besteht. Innerhalb dieser PV vermehrt sich der Parasit asexuell durch Endodyogenie (es entstehen zwei Tochterzellen in einer Mutterzelle), bis die Wirtszelle ganz ausgefüllt ist und rupturiert. Die dabei frei werdenden Tachyzoiten infizieren daraufhin erneut umgebende Zellen; eine Phase, die als akute Infektion beschrieben und bald durch die stark einsetzende Immunantwort begrenzt wird. Zu diesem Zeitpunkt kann eine kongenitale Übertragung von der Mutter auf ihr ungeborenes Kind erfolgen. Durch die einsetzende Immunantwort des Organismus wird die schnelle Vermehrung der Parasiten gestoppt und die Differenzierung der Tachyzoiten zu der sich langsam teilenden Form (Bradyzoiten) initiiert. Bradyzoiten besitzen wie Sporozoitien eine feste Zystenhülle und teilen sich durch Endodyogenie (Dubey, 1998). Ihr Auftreten markiert die Phase der chronischen Infektion. Bradyzoiten können in allen Geweben, vornehmlich Gehirn, Skelettmuskel und Herz in Form von Gewebezysten lebenslang persistieren (Frenkel und Escajadillo, 1987) und sich im Falle einer Immunsuppression (z.B. AIDS oder transplantierte Patienten) zu Tachyzoiten rekonvergieren und damit wiederum zu einer akuten Infektion führen.

Neben den möglichen Infektionswegen der oralen Aufnahme von Sporozoitien bzw. der Übertragung von Tachyzoiten durch die Mutter auf ihr Kind, stellt der Verzehr von zystenhaltigem Gewebe (z.B. rohes Fleisch) eine weitere Infektionsmöglichkeit dar.

1.2 Invasion in die Wirtszelle und intrazelluläre Entwicklung

Als obligat intrazellulärer Parasit ist die Lebensdauer von *T. gondii* extrazellulär beschränkt; die schnelle Neuinfektion von Wirtszellen ist daher zwingend notwendig. Die schnelle Invasion des Parasiten in die Wirtszelle nimmt folglich eine zentrale Rolle ein beim erfolgreichen Überleben im Wirt.

T. gondii selbst initiiert einen aktiven Prozess, bei dem sich aus der Wirtszellmembran ein neues subzelluläres Kompartiment, die parasitophore Vakuole formt (Lingelbach und Joiner, 1998). In der PV kann sich der Parasit frei vermehren, ohne vom lysosomalen System zerstört zu werden (Sibley et al., 1985). Dieser vom Parasiten initiierte aktive Prozess, in dem die Wirtszelle eine eher passive Rolle spielt, könnte auch erklären, warum *T. gondii* in der Lage ist, ein so breites Spektrum an Zellen zu infizieren.

Das aktive Eindringen von *T. gondii* in die Wirtszelle ist von Phagozytose oder Endozytose, welche bei anderen intrazellulären Parasiten vorkommen, (Sibley und Andrews, 2000) abzugrenzen. Die Phagozytose beschreibt einen Prozess, der im Bereich von Minuten vollzogen wird. *T. gondii* hingegen benötigt nur 20 Sekunden für die Invasion der Zelle. Im Gegensatz zur Phagozytose lassen sich keine Ausstülpungen der Wirtszelle, keine Actin-Mikrofilament-Reorganisation oder Tyrosin-Phosphorylierung der Wirtszelle erkennen (Morisaki et al., 1995). Des Weiteren fallen die ungewöhnliche Deformation des Parasiten und die Polarität während des Eindringens von *T. gondii* in die Wirtszelle auf, was zusätzlich auf einen vom Parasiten aktivierten Prozess hindeutet (Black und Boothroyd, 2000).

Für das Eindringen in die Wirtszelle, ist die Motilität von *T. gondii* zwingend notwendig (Dobrowolski und Sibley, 1996). Fortbewegungen durch Gleiten ist hoch konserviert im Stamm der *Apicomplexa* und benötigt keine Organellen wie Zilien oder Flagellen (Sibley, 2003), sondern wird vielmehr durch einen Actin-Myosin-Motor generiert (Keeley und Soldati, 2004; Sibley, 2004). Durch Gleiten in Form von helikaler Rotation kommt der Parasit mit seinem apikalen Ende in direkten Kontakt mit der Wirtszelle (Hakansson et al., 1999).

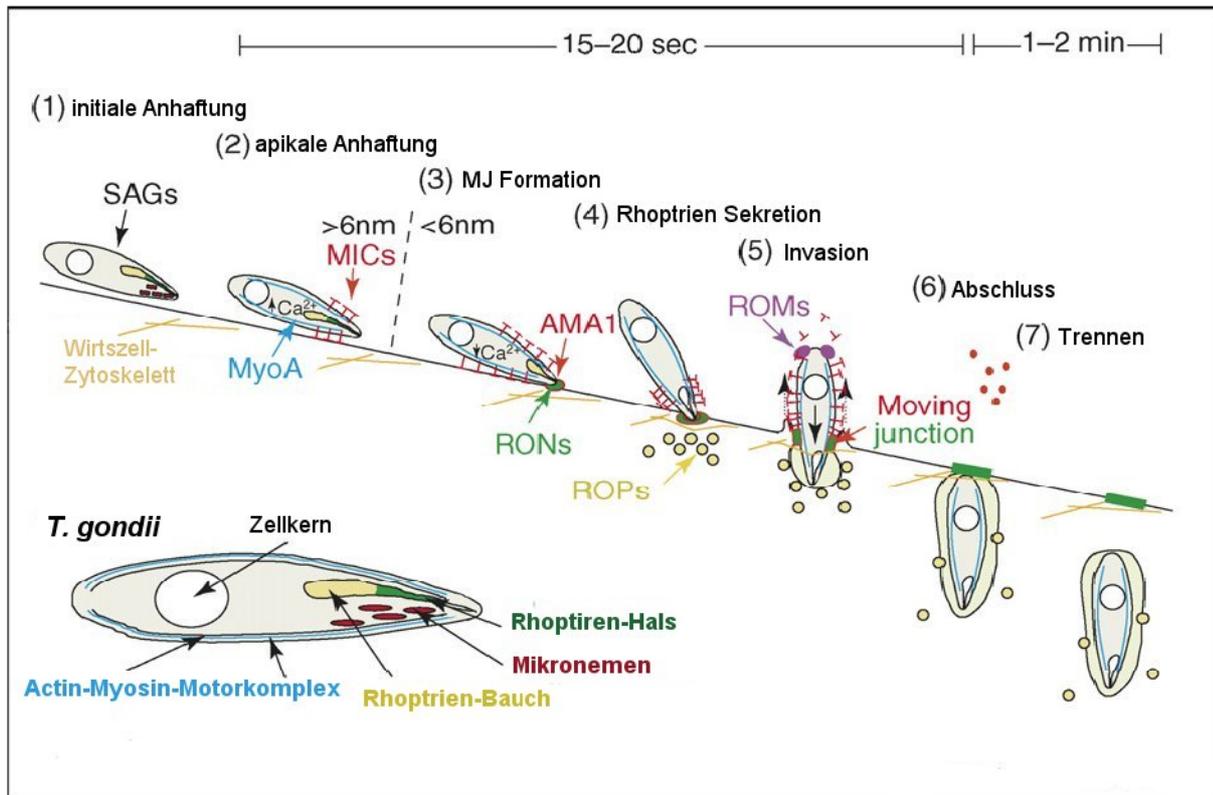


Abb. 2: Ablauf der Invasion von *T. gondii* in die Wirtszelle

Die Invasion von *T. gondii* lässt sich in sieben Schritte unterteilen, beginnend mit einer initialen noch reversiblen (1), gefolgt von einer festeren, apikalen (2) Anhaftung des Parasiten an die Wirtszelle. Schritt 3 und 4 führen zur Entstehung der „moving junction“ (MJ) durch Sekretion von Mikronemen- und Rhoptrien-Proteinen. Durch die MJ vermittelt stülpt sich der Parasit in die Wirtszelle hinein (5) und es entsteht die parasitophore Vakuole. Der Abschluss der PV (6) und das Abtrennen von der Wirtszellmembran (7) schließen den Prozess der Invasion ab (verändert nach (Carruthers und Boothroyd, 2007)).

Das Eindringen von *T. gondii* in die Wirtszelle lässt sich wie in Abb. 2 gezeigt in mehrere Schritte untergliedern (Carruthers und Boothroyd, 2007), beginnend mit einer zunächst noch reversiblen, initialen Anhaftung an die Wirtszelloberfläche. Diese Anhaftung wird vermutlich durch das Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte *T. gondii* Oberflächenantigen SAG vermittelt (Manger et al., 1998). Diese SAG-Proteine sind gleichmäßig auf der Oberfläche des Parasiten verteilt und haben so die optimale Position für eine initiale Bindung. Experimente mit anti-SAG-Antikörper führten zu einer reduzierten Invasion von *T. gondii* in die Wirtszelle (Mineo und Kasper, 1994).

Auf diese erste schwache folgt nun eine gerichtete Bindung zwischen der Wirtszelle und dem apikalen Ende des Parasiten. Hierbei spielen kleine, zigarrenförmige, sekretorische Organellen namens Mikronemen (MIC) eine wichtige Rolle. In dieser Phase konnte beobachtet werden, wie die MIC-Proteine Calcium-abhängig an der apikalen Oberfläche des

Parasiten sezerniert werden (Lovett et al., 2002). Viele MIC-Proteine besitzen hochkonservierte Bindungs-Domänen, wie beispielsweise für Lectin, Thrombospondin und Epidermal-Growth-Factor (Tomley und Soldati, 2001). Eine Inhibition der Ausschüttung von MIC-Proteinen geht einher mit einer Invasionshemmung von *T. gondii* in die Zelle (Carruthers et al., 1999).

Im nächsten Schritt wird die Bindung zwischen Parasit und Wirtszelle enger (< 6 nm), wobei ein weiteres Mikronemales-Protein, genannt AMA1, zu dieser Bindung beiträgt (Alexander et al., 2005). Zusätzlich werden Proteine aus den Rhoptrien-Organellen Hals (RON) und Körper (ROP) ausgeschüttet, welche zusammen mit AMA1 einen stabilen Komplex formen, der an der Wirtszell-Oberfläche zu einer ringförmigen Struktur, der „moving junction“ (MJ) fusioniert (Lebrun et al., 2005). Die so entstehende MJ ermöglicht daraufhin den Eintritt des Parasiten in die Wirtszelle (Aikawa et al., 1978), indem sie die Wirtszellmembran über den Parasiten stülpt, wodurch letztlich die PV gebildet wird (Carruthers und Boothroyd, 2007). Fragen nach dem genauem Ablauf, Antrieb und möglichen Fixpunkten bei diesem Prozess bleiben noch offen. Zu untersuchen gilt es, ob die RON-Proteine möglicherweise als Anker in der Wirtszellmembran fungieren und somit dem MJ Komplex als ein Widerlager beim Prozess des Einstülpens dienen (Bradley und Sibley, 2007; Carruthers und Boothroyd, 2007).

Eine weitere für das Überleben des Parasiten essentielle Funktion der MJ, ist das aktive Entfernen von Wirtzell- und Parasitenmembranproteinen aus der entstehenden PV (Charron und Sibley, 2004; Mordue et al., 1999a). Dies könnte erklären, warum die PV nicht mit dem lysosomalen System interferiert (Mordue et al., 1999b). Wenn man die Invasion mit Cytochalsin (Cyt D), welches die Motilität durch Gleiten hemmt, unterbindet, findet dennoch die Sekretion von Mikronemalen- und Rhoptrien-Proteinen statt. Es werden bei der versuchten Invasion in die Wirtszelle im Gegensatz zur PV sogenannte e-Vakuolen (empty=leer) gebildet, in denen sich kein Parasit befindet. Durch diese Experimente von Hakansson konnte demonstriert werden, dass wesentliche Eigenschaften der PV, wie das Rekrutieren von Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum (ER), sowie das Verhindern einer Fusion mit Endolysosomen, auch bei e-Vakuolen stattfindet und somit durch die Sekretion von Mikronemalen- und Rhoptrien-Proteinen bedingt ist (Hakansson et al., 2001).

Das endgültige Ablösen der PV von der Wirtszellmembran dauert im Verhältnis zu den ersten Schritten, die nur 15-20 Sekunden (sek) benötigen, mit 1-2 Minuten (min) relativ lange (Suss-Toby et al., 1996).

Nach der Formation der PV werden aus den Dense Granula die so genannten GRA-Proteine ausgeschüttet, welche wiederum das intrazelluläre Kompartiment, in dem sich der Parasit entwickelt, modifizieren. Man vermutet, dass die GRA-Proteine eine strukturelle Funktion innerhalb der PV (Tubulovesikuläres Netzwerk) (Sibley et al., 1986; Sibley et al., 1995) und

eine Beteiligung am metabolischen Austausch zwischen PV und Wirtszelle haben (Lebrun et al., 2007; Ossorio et al., 1994). Für Moleküle kleiner als 1300 Dalton (Da) konnte ein freier bidirektionaler Austausch über die PV-Membran (PVM) nachgewiesen werden (Schwab et al., 1994).

1.2.1 Rolle der Rhoptrien bei der Entstehung der parasitophoren Vakuole

T. gondii Tachyzoiten besitzen 8 – 12 Rhoptrien mit einer Länge von jeweils 2-3 Mikrometern (μm) (Boothroyd und Dubremetz, 2008). Sie sind im apikalen Komplex lokalisiert und lassen sich anhand ihres Proteininhaltes in ein Bauch- und Hals-Subkompartiment gliedern (Bradley et al., 2005). Bisher wurden insgesamt 29 Rhoptrien-Proteine beschrieben, wovon sich 24 im Bauch- und 5 im Hals-Subkompartiment befinden.

Die RON-Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der MJ (Alexander et al., 2005; Lebrun et al., 2005). Durch direkten Kontakt der apikalen Oberfläche mit der Wirtszelle wird durch noch unbekannte Mechanismen die Sekretion der RON-Proteine initiiert. Hierbei konnte an der Spitze des Parasiten eine deutliche Öffnung beobachtet werden, durch welche die RON-Proteine sekretiert werden (Nichols et al., 1983). Die RON-Proteine 2, 4 und 5 formen zusammen mit dem Mikronemalen-Protein AMA1 einen Komplex der mit der MJ kolokalisiert (Alexander et al., 2005; Lebrun et al., 2005).

ROP-Proteine hingegen scheinen eine völlig andere Rolle als RON-Proteine zu spielen. Für ROP-Proteine gibt es drei unterschiedliche Lokalisationen, das Lumen der entstehenden PV, die PVM oder der Wirtszellkern (Boothroyd und Dubremetz, 2008).

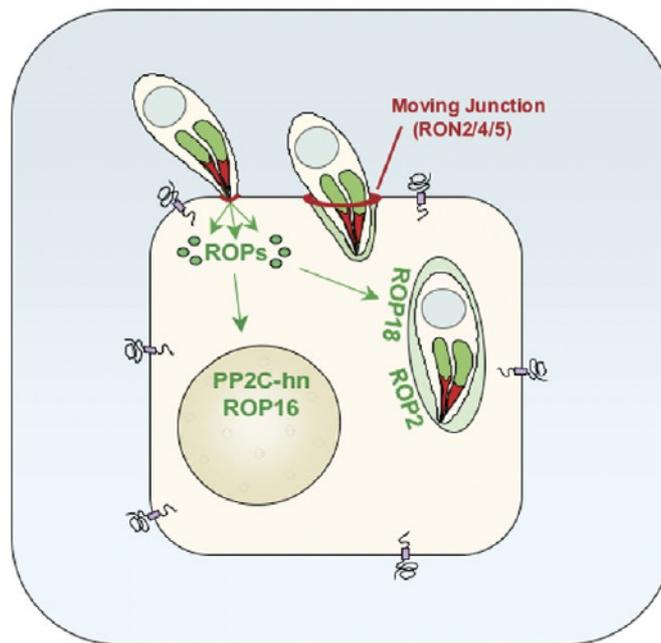


Abb. 3: Sekretion der Rhoptrien-Proteine während der Wirtszellinvasion

Während der Invasion von *T. gondii* in die Wirtszelle werden Rhoptrien-Proteine aus dem Bauch- (ROP) sowie dem Halsteil (RON) der Organellen sekretiert. Die RON-Proteine 2, 4 und 5 sind an der Bildung der MJ beteiligt, wohingegen die ROP-Proteine zum einen an der PV (ROP18, ROP2) zum anderen im Zellkern lokalisieren (verändert nach (Bradley und Sibley, 2007)).

Ein Beispiel für die Lokalisation im Lumen der entstehenden PV ist ROP1 (Ossorio et al., 1992). Interessanterweise kann ROP1 in einem Parasiten synthetisiert werden und sich nach Invasion in der PV eines anderen Parasiten wiederfinden. Es wäre möglich, dass ROP1 ins Zytosol der Wirtszelle sekretiert wird und sich daraufhin den Weg zur nächst gelegenen PV sucht (Hakansson et al., 2001).

Proteine aus der ROP2-Familie, zu denen unter anderem ROP16 und ROP18 gehören, stellen ein Beispiel für die zweite Lokalisationsmöglichkeit dar. Man findet sie als integrales Membranprotein an der PVM wieder (Beckers et al., 1994; Carey et al., 2004; El Hajj et al., 2007b; Herion et al., 1993). Eine Besonderheit dieser Gruppe ist die Kinaseaktivität, die zumindest für ROP18 sicher beschrieben ist (El Hajj et al., 2006; El Hajj et al., 2007a). Vermutlich haben andere Mitglieder der ROP2-Familie die Fähigkeit der Protein-Phosphorylierung trotz vorhandener Kinase-Domäne verloren (Hanks und Hunter, 1995). Für ROP18 konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der infizierten Zelle konzentriert an der PVM gefunden wird, genauer genommen an der zytosolischen Seite hin zur Wirtszelle (El Hajj et al., 2007a). Ferner scheinen Mitglieder dieser Familie mit der Rekrutierung von Wirtszellmitochondrien sowie Endoplasmatischem Retikulum (ER) an die PV assoziiert zu

sein. Dies dient wohlmöglich, dem Zugang von Nährstoffen aus der Wirtszelle (Sinai et al., 1997; Sinai und Joiner, 2001).

ROP16, ein weiteres Mitglied der ROP2-Familie (Saeij et al., 2007), und eine Klasse 2 c Protein-Phosphatase (PP2C) (Gilbert et al., 2007) dienen als Beispiel für die Lokalisation im Wirtszellkern. Erstaunlicherweise können diese beiden Proteine bereits 15 min nach Infektion im Wirtszellkern nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass sie, um dort hinzugelangen, konventionelle Kern-Lokalisations-Signale (NLS) benutzen. Über ihre eigentliche Funktion im Wirtszellkern ist jedoch noch sehr wenig bekannt.

1.3 Virulenz von *Toxoplasma gondii* in der Maus

Durch genetische und isoenzymatische Analysen konnte die *T. gondii* Population in drei unterschiedliche klonale Linien eingeteilt werden, die jedoch genetisch zu 98% miteinander übereinstimmen (Howe und Sibley, 1995; Sibley und Boothroyd, 1992). Es wird vermutet, dass Nachkommen aus zwei ursprünglichen Genpools durch evolutionären Selektionsdruck vor ca. 10.000 Jahren zu einer kleinen Anzahl eng miteinander verwandter Nachkommen geführt haben, welche sich in weiten Teilen der Welt durchgesetzt haben (Su et al., 2003). So existieren für die meisten Gene der unterschiedlichen *T. gondii*-Stämme nur zwei unterschiedliche Allele (Grigg et al., 2001a).

Virulenz von *T. gondii* wird definiert über die letale Infektionsdosis (LD) in Mäusen (Sibley et al., 1999). Als Infektionsweg wird normalerweise die intraperitoneale Applikation von Tachyzoiten gewählt, da bei der Verfütterung von Gewebezysten starke Schwankungen in Größe und Anzahl der darin enthaltenen Bradyzoiten auftreten können (Weiss und Kim, 2000).

Es ist schon länger bekannt, dass die Virulenz verschiedener *T. gondii* – Isolate von einander abweicht (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1976). So lassen sich Toxoplasmen in drei Gruppen einteilen, wobei zur Gruppe I die hochvirulenten Stämme wie beispielsweise RH und BK Toxoplasmen gehören, die bereits bei einer Infektionsdosis von einem einzelnen Parasiten zu einer 100%igen Mortalität (LD₁₀₀) führen (Howe et al., 1996). Hingegen führt eine Infektionsdosis von über 1000 Parasiten der schwach virulenten Stämme der Gruppe II und III (z.B.: ME49 und DX Toxoplasmen) nur zu einer 50%igen Mortalität (LD₅₀) und zum chronischen Stadium der Infektion (Sibley et al., 2002).

Die Virulenz von *T. gondii* kann jedoch auch anhand weiterer Kriterien wie z.B. der Migration und Wachstumsrate spezifiziert werden. Das Überwinden biologischer Barrieren (Schleimhaut des Verdauungstraktes oder Blut-Hirn-Schranke) ist essentiell für die Ausbreitung von *T. gondii* im Wirt (Barragan und Sibley, 2003). Gezeigt werden konnte, dass

sowohl die Transmigration über polarisierte Zellen, als auch die Migration über extrazelluläre Matrix sowie die *ex vivo* Penetration der Lamina Propria und Submucosa bei Typ I Toxoplasmen im Vergleich zu Typ II und III verbessert ist (Barragan und Sibley, 2002).

Eine hohe Parasitenlast trägt durch Überstimulation des Immunsystems und eine dadurch erhöhte Apoptoserate sowie entstehende Organschäden maßgeblich zur Pathologie von *T. gondii* in der Maus bei (Gavrilescu und Denkers, 2001; Mordue et al., 2001; Nguyen et al., 2003). Die hohe Parasitenlast in virulenten Typ I Toxoplasmen kann zum einen durch eine kürzere Verdopplungszeit, zum anderen aber auch durch eine verbesserte Abwehr gegen das Wirtsimmunsystem oder durch verzögerte Konversion in das langsam wachsenden Bradyzoiten-Stadium zustande kommen (Saeij et al., 2005). Bezüglich der Verdopplungszeit fanden sich nur geringe Unterschiede im Hinblick auf die verschiedenen *T. gondii*-Stämme, die nicht die dramatischen Virulenzunterschiede erklären können (Sibley et al., 2002). Es wurde dennoch beobachtet, dass die virulenten Typ I Toxoplasmen länger infektiös bleiben und somit möglicherweise eine höhere Reinfektionsrate besitzen. Dies korreliert mit der weit verbreiteten Beobachtung, dass Typ I Toxoplasmen sehr viel schneller den Monolayer in einer Zellkultur lysieren als Typ II und III (Saeij et al., 2005).

Versuche, die Virulenz von *T. gondii* durch Knockout-Experimente auf einzelne Gene zurückzuführen, wurden seit längerem unternommen. Bisher konnten allerdings keine eindeutigen Virulenzfaktoren ausfindig gemacht werden. Zu den mit Virulenz assoziierten Proteinen zählen beispielsweise das Oberflächenantigen SAG3 (Dzierszynski et al., 2000), das Dense Granula Protein 2 (Mercier et al., 1998) und die Mikronemen-Proteine MIC 1 und 3 (Cerede et al., 2005). Erst kürzlich konnte ein neuer Virulenzfaktor (ROP18) durch genetische Kreuzungsexperimente identifiziert werden (Taylor et al., 2006).

Wenig erforscht ist bis zum heutigen Tag, inwiefern sich das Virulenz-Modell der Maus auf andere Spezies bzw. auf den Menschen übertragen lässt (Boothroyd und Grigg, 2002). Auffallend ist, dass sich in den USA bei Menschen mit schwerer okulärer Toxoplasmose vorwiegend Typ I Toxoplasmen finden lassen (Grigg et al., 2001b), obwohl in den USA Typ II Toxoplasmen die humane Infektion dominieren (Darde, 2004). Des Weiteren wurden Typ I Toxoplasmen mit schwerer kongenitaler Toxoplasmose (Fuentes et al., 2001) sowie Enzephalitis bei AIDS Patienten (Khan et al., 2005) in Verbindung gebracht. Es ist bemerkenswert, dass schwerwiegende toxoplasmen-bedingte Erkrankungen beim Menschen durch Typ I ausgelöst werden, während Typ II Toxoplasmen den weitverbreitetsten Typ unter Menschen und Zuchttieren darstellen (Sibley et al., 1999).

1.3.1 ROP18, ein neuer Virulenzfaktor?

Wie bereits erwähnt, wurde schon seit längerem durch Kreuzungsversuche unterschiedlich virulenter Stämme nach spezifischen Gen-Loci gesucht, die für Virulenz-Gene kodieren (Grigg et al., 2001a). In einer großen Studie wurden virulente Typ I Toxoplasmen mit avirulenten Typ III Toxoplasmen gekreuzt (Su et al., 2002). Die hierbei entstandenen Nachkommen variierten zwischen den beiden Extremen ihrer Elterngenerationen in Bezug auf Migration, Transmigration und akute Sterblichkeit oder übertrafen diese sogar (Taylor et al., 2006). Durch die Analyse quantitativer trait loci (QTL) konnte eine starke Assoziation dieser phänotypischen Merkmale auf Chromosom VIIa gefunden werden. Nach Abgleich der QTL mit der Genom-Sequenz der Region wurden 21 Gene gefunden, die möglicherweise für diese Phänotypen verantwortlich sein könnten. In der Analyse der Expressionshäufigkeit dieser Gene (Kissinger et al., 2003) fiel ROP18 mit ungewöhnlich vielen Polymorphismen unter den Typ I Toxoplasmen auf. Im direkten Vergleich des Allels der Typ III Toxoplasmen unterscheidet sich das Allel von Typ I in 78 Positionen, was 14% entspricht, verglichen zu der normalerweise vorkommenden Abweichung von 1-2% im Genom unterschiedlicher Stämme (Su et al., 2003). Zusätzlich ließen sich durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Microarray Analysen nur für ROP18 starke Unterschiede bezüglich des Expressionslevels der Allele beider Stämme feststellen, wobei das Allel aus Typ III relativ zum Typ I Allel kaum nachweisbar war (Taylor et al., 2006). Um den Effekt von ROP18 isoliert zu betrachten, wurde das Allel aus Typ I in Typ III Toxoplasmen exprimiert. Dies führte, gemessen an Hand von Mortalität in der Maus, um eine bis zu 4-5 log Stufen erhöhte Virulenz der Parasiten gegenüber dem Wildtyp. Ein ähnlicher Versuch wurde mit dem ROP18 Allel aus Typ II Toxoplasmen unternommen, wobei auch hier die transfizierten Typ III Toxoplasmen in der Maus bis zu Größenordnungen (10^4) virulenter waren als der Wildtyp (Saeij et al., 2006).

Wie bereits in Abschnitt I 1.2.1 erwähnt, ist ROP18 in der Lage Proteine zu phosphorylieren (El Hajj et al., 2006). Die Rolle dieser Kinaseaktivität im Zusammenhang mit der beschriebenen Virulenz ist ebenfalls untersucht worden und ergab sich als essentiell für diese. So zeigte sich keine gesteigerte Virulenz gegenüber dem Wildtyp, wenn das transfizierte ROP18-Protein durch eine Mutation in seiner Kinaseaktivität gehemmt wurde (El Hajj et al., 2007a). Der zugrunde liegende Mechanismus dieser kinasebedingten Virulenzsteigerung ist noch nicht geklärt.

Zusammengefasst sind sowohl die unterschiedlich starke Expression als auch die unterschiedlichen Allele des ROP18 Gens für die Virulenzunterschiede verantwortlich (Taylor et al., 2006).

2 Immunabwehr gegen *Toxoplasma gondii*

Ausgehend von einer evolutionären Perspektive ist das primäre Ziel von *T. gondii* die maximale Vermehrung im Wirt ohne diesen dabei zu töten, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Transmission am höchsten ist, wenn der Wirt gefressen wird.

Eine starke Vermehrung des Parasiten in der akuten Phase kann zu einer überschießenden Immunantwort des Wirtes führen. Diese Immunantwort kann so stark ausgeprägt sein, dass sie zum Tod des Wirtes führt. Um dies zu verhindern, ist eine genaue Abstimmung einerseits der starken Wirtszellimmunantwort einerseits und der immunsuppressiven bzw. modulatorischen Strategien des Parasiten andererseits nötig (Aliberti, 2005).

Bei der Immunantwort des Wirtes gegen *T. gondii* ist die zelluläre Immunabwehr von zentraler Bedeutung (Lieberman und Hunter, 2002). Da *T. gondii* ein intrazellulärer Parasit und somit für Antikörper schlecht zu erreichen ist, spielt die humorale Immunantwort nur eine untergeordnete Rolle. Es wurde dennoch beschrieben, dass in der Mukosa des Darms Antikörper(Ak)-vermittelte Abwehrmechanismen die Verbreitung des Parasiten verlangsamen können (Chardes und Bout, 1993). Die tragende Abwehr erfolgt trotzdem zellulär; so konnten z.B. T-Zell defiziente Mäuse trotz Gabe von anti-*T. gondii*-Ak die Infektion nicht überleben (Lindberg und Frenkel, 1977).

Bei einer primären Infektion mit *T. gondii* kommt es durch Zellen des angeborenen Immunsystems zu einer starken Sekretion von Interleukin-12 (IL-12) und anschließend Interferon- γ (IFN- γ), was zu einer T-Helferzell (T_{H1}) basierten Immunantwort führt (Miller et al., 2009). Die T_{H1} Antwort ist charakterisiert durch eine frühe IFN- γ Produktion, erhöhte Phagozytenaktivität durch IFN- γ aktivierte Makrophagen sowie durch eine zytotoxische T-Zell-Antwort (Zinkernagel, 2005).

IL-12 stellt ein essentielles Zytokin bei der Bekämpfung von *T. gondii* Infektionen dar. IL-12 Depletion durch Ak oder IL-12 defiziente Mäuse weisen stark reduziert IFN- γ Level und eine 100%ige Mortalität nach Infektion mit *T. gondii* auf (Combe et al., 2005; Gazzinelli et al., 1994; Yap et al., 2000). IL-12 wird von phagozytierenden Zellen wie beispielsweise Makrophagen oder antigenpräsentierenden Zellen (APC) (z.B.: Dendritische Zellen) in der frühen Phase der Infektion produziert (Reis e Sousa et al., 1997) (Yap und Sher, 1999). Es gibt mehrere beschriebene Wege wie *T. gondii* die Produktion von IL-12 in diesen Zellen induziert. Eine Möglichkeit bietet das spezifische *T. gondii* Protein Cyclophilin-18, welches an Chemokin-Rezeptoren (CCR5) auf dendritischen Zellen bindet und so die Produktion von IL-12 fördert (Abb. 4) (Aliberti et al., 2003). CCR5 defiziente Mäuse zeigen während der akuten Infektion eine verringerte IL-12 Produktion (Aliberti et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit die IL-12 Produktion zu induzieren besteht über den Toll-Like-Rezeptor (TLR) Signalweg, für den das Adapterprotein (MyD88) essentiell ist. So konnte gezeigt werden, dass MyD88 defiziente

Mäuse einen ausgeprägten Defekt bei der IL-12 Produktion aufweisen (Scanga et al., 2002). Mittlerweile ist Profilin als Toll-Like-Rezeptor (TLR) Ligand identifiziert worden. Das Toxoplasma-Protein Profilin wird von TLR11 erkannt und regt so die dendritischen Zellen zur IL-12 Produktion an (Yarovinsky et al., 2005).

Die wichtigste Funktion von IL-12 stellt die Induktion der IFN- γ Produktion dar (Abb. 4). Dies geschieht während der frühen Phase der Infektion durch Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allen den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Durch IL-12 wird ebenfalls die Proliferation von Typ 1 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als Teil der adaptiven Immunantwort gefördert, welche wiederum IFN- γ sezernieren (Gazzinelli et al., 1992; Reis e Sousa et al., 1997). Typ 1 Zellen stellen auch in der chronischen Phase der Infektion eine wichtige IFN- γ Quelle dar.

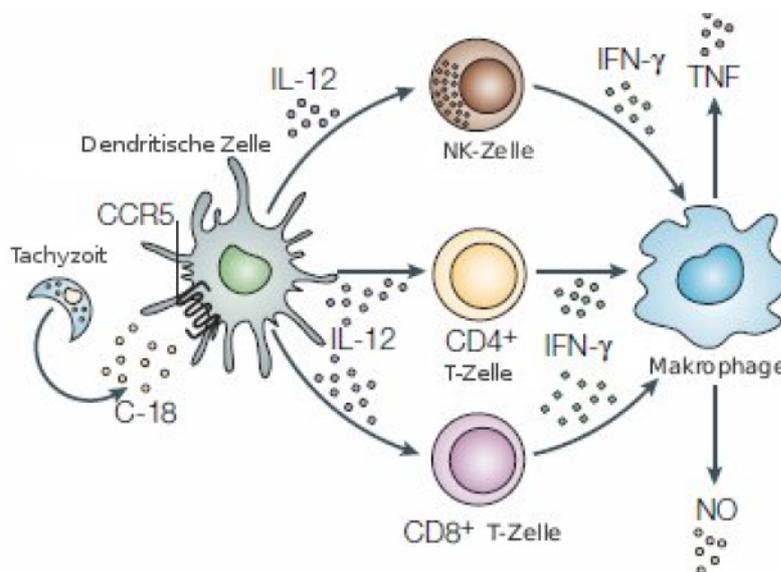


Abb. 4: Immunantwort während der frühen Phase der Infektion

Das Tachyzoiten Protein Cyclophilin-18 bindet an Chemokin-Rezeptoren (CCR5) auf dendritischen Zellen und induziert so die Produktion von IL-12. NK-Zellen sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen werden durch IL-12 zur Produktion von IFN- γ angeregt. IFN- γ wiederum induziert diverse antiparasitäre Effektormechanismen, hier beispielhaft an der Aktivierung von Makrophagen gezeigt (verändert nach (Aliberti, 2005)).

IFN- γ gilt als wichtigster Auslöser für antiparasitäre Effektormechanismen. Mäuse, die IFN- γ defizient sind (Scharton-Kersten et al., 1996), oder keine IFN- γ Rezeptoren besitzen (Tsuji et al., 1995), verfügen über eine unzureichende Immunantwort und sterben einige Tage nach der Infektion. Die anhaltende Produktion von IFN- γ ist essentiell sowohl für die akute als auch für die chronische Infektion mit *T. gondii* (Aliberti, 2005). IFN- γ spielt in der akuten Phase eine entscheidende Rolle bei der Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten

(Bohne et al., 1993) und unterdrückt während der chronischen Phase die Rekonversion in die schnell replizierenden Tachyzoiten (Jones et al., 1986). Zu den IFN- γ produzierenden Zellen gehören neben NK-Zellen auch T-Zellen und APC (Suzue et al., 2003).

2.1 Interferon- γ induzierte Abwehrmechanismen

Bisher wurden mehrere IFN- γ abhängige Mechanismen beschrieben, die in der Lage sind, die Proliferation von *T. gondii* zu verhindern (Suzuki, 2002). Dazu zählen sowohl die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffintermediate (ROS) als auch die Begrenzung der Verfügbarkeit an freiem Eisen, der Abbau von intrazellulärem Tryptophan sowie die p47 GTPasen.

NO wird beim Stoffwechsel von L-Arginin zu Citrullin durch die NO-Synthetase produziert. Es wird durch zwei konstitutiv exprimierte Isoenzyme hergestellt. Die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) spielt die entscheidende Rolle bei der Abwehr von Pathogenen. NO kann durch Hemmung von essentiellen mitochondrialen Enzymen Tachyzoiten direkt töten (Brunet, 2001), es kann jedoch während der akuten Infektion zu ausgeprägten Schäden für den Wirt kommen. So weisen iNOS defiziente Mäuse während der akuten Phase weniger intestinale und hepatische Schäden und dadurch eine geringere Mortalität auf, die Parasitenlast ist hier allerdings erhöht. Während der chronischen Phase führt die unkontrollierte Vermehrung von Tachyzoiten im ZNS in diesen Mäusen jedoch zu einer erhöhten Sterblichkeit (Khan et al., 1997; Scharon-Kersten et al., 1997). NO spielt ebenfalls eine Rolle in der Stadienkonversion von Tachyzoiten zu Bradyzoiten (Bohne et al., 1994).

IFN- γ induziert in Makrophagen die Produktion von reaktiven Sauerstoffintermediaten, wie z.B. Peroxid, Hydroxyradikale und Singulett-Sauerstoff, die eine toxoplasmazide Wirkung besitzen. Dies konnte für murine (Murray et al., 1985) und humane (Aline et al., 2002) Makrophagen gezeigt werden.

Eisen ist ein elementarer Kofaktor im Stoffwechsel aller eukaryontischen Zellen. Die Limitierung von frei verfügbarem Eisen in der Zelle stellt einen weiteren IFN- γ abhängigen Mechanismus zur Bekämpfung von *T. gondii* dar. Dieser Mechanismus konnte in Enterozyten des Verdauungstraktes von Ratten nachgewiesen werden und stellt somit wahrscheinlich eine erste Linie der Abwehr dar (Dimier et al., 1998).

Im Stoffwechsel von *T. gondii* ist Tryptophan eine essentielle Aminosäure. In humanen Zellen wird nach IFN- γ Stimulation das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) exprimiert, welches zum Abbau von Tryptophan führt (Daubener et al., 2001). Im Gegensatz zu humanen Zellen ist die Rolle von IDO bei der Abwehr von *T. gondii* in murinen Zellen unklar.

IDO ist an der Kontrolle von *T. gondii* in murinen Astrozyten nicht beteiligt (Halonen und Weiss, 2000).

Erst kürzlich wurde eine Gruppe von IFN- γ induzierten Genen entdeckt, die nach der Größe ihres Genprodukts (47-48 kDa) und der Fähigkeit Guanosintriphosphat (GTP) zu binden und zu hydrolysieren benannt wurde. Diese Gruppe von Proteinen wird p47 GTPasen oder auch „immunity-related GTPases“ (IRG) genannt (Gilly und Wall, 1992). Das Mausgenom kodiert für 23 dieser p47 GTPasen (Bekpen et al., 2005). Nach Stimulation mit IFN- γ sind sie mit intrazellulären Membranen, einschließlich Golgiapparat und ER, assoziiert (Martens et al., 2004; Taylor et al., 1997; Zerrahn et al., 2002). Die p47 GTPasen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von *T. gondii* in der Maus (Taylor et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die defizient für die p47 GTPasen IGTP oder LRG-47 sind, die akute Phase der Infektion mit *T. gondii* nicht überleben (Collazo et al., 2001; Taylor et al., 2000). Für murine Astrozyten, die für die p47 GTPase IIGP defizient waren, ergab sich eine reduzierte Resistenz gegenüber *T. gondii* (Martens et al., 2005).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die p47 GTPasen sowohl auf zellulärer Ebene als auch im Gesamtorganismus der Maus eine tragende Rolle bei der Immunabwehr von *T. gondii* spielen. Hierbei ist der Mechanismus der Immunabwehr noch weitgehend ungeklärt. Gleichwohl konnte nach Infektion von IFN- γ stimulierten murinen Astrozyten für einige Mitglieder der p47 GTPasen (IGTP, GTPI, TGTP und IRG-47) eine starke Assoziation mit der PV gezeigt werden (Martens et al., 2005). Für LRG-47 konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden (Butcher et al., 2005) (Martens et al., 2005). Dennoch scheint gerade diese GTPase für die Abwehr von *T. gondii* eine entscheidende Rolle zu spielen. Zum einen wurde gezeigt, dass LRG-47 defiziente Mäuse hoch suszeptibel gegenüber Toxoplasmen sind. Sie sterben zwischen Tag neun und elf nach Infektion mit *T. gondii* vergleichbar mit IFN- γ defizienten Mäusen (Collazo et al., 2001). Zum anderen wurde nachgewiesen, dass LRG-47 zusammen mit GTPI und IGTP für die korrekte Lokalisation weiterer GTPasen benötigt wird (Hunn et al., 2008). LRG-47 scheint seinen schützenden Abwehrmechanismus also nicht lokal an der PV zu entfalten, sondern durch bisher noch nicht bekannte übergeordnete Effekte. Außerdem wird für LRG-47 und IGTP ein möglicher Mechanismus bei der Prozessierung und dem Transport von Proteinen am ER diskutiert (Halonen et al., 2001) (Taylor et al., 1997).

Von den Mitgliedern der p47 GTPasen ist IIGP sowohl biochemisch als auch strukturell am besten untersucht worden (Ghosh et al., 2004; Uthaiyah et al., 2003). Die Interaktion von IIGP Aggregaten an der PV scheint einem Reifungsprozess zu unterliegen, der mit der Ruptur der PVM und letztendlich mit der Tötung des Parasiten einhergeht. Neben der Lokalisation an der PV konnte IIGP auch direkt an der Toxoplasmenmembran nachgewiesen werden, was vermutlich zu dessen Zerstörung führt (Martens et al., 2005). Eine weitere GTPase - IGTP -

konnte in Makrophagen ebenfalls direkt an der Toxoplasmenmembran nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Ling in Makrophagen zeigen, dass IGTP eine wesentliche Rolle in einem mehrstufigen Prozess spielt, der mit Autophagie des Parasiten endet (Ling et al., 2006). Hierbei erkennt man zuerst zackenförmige Einkerbungen der PVM hin zum Parasiten, gefolgt vom Aufbrechen und anschließender Vesikel-Bildung der PVM-Fragmente. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Martens in Astrozyten, bei denen keine Autophagie der Vakuole beobachtet wurde, konnte nun in Makrophagen eine Zerstörung der Toxoplasmenmembran mit anschließend einhergehender Autophagie gezeigt werden. IGTP defiziente Zellen hatten eine 2-10fache verminderte Autophagosom-Bildung durch Fusion der PV mit Lysosomen (Ling et al., 2006).

Für die Elimination von *Mykobakterium tuberculosis* durch p47 GTPasen wird einerseits eine verstärkte Ansäuerung der PV und Fusion mit Lysosomen vermutet (MacMicking, 2003) andererseits eine regulatorische Funktion bei der Autophagie. Die Modulation des Lipidstoffwechsels zwischen dem Golgi Apparat und der PV von *Chlamydia trachomatis* durch p47 GTPasen wurde ebenfalls beschrieben (Abb.5) (Taylor et al., 2007). Für LRG-47, wird eine stimulierende Rolle der hämatopoetischen Vorläuferzellen bei der Infektion mit *Mykobakterium avium* vermutet (Taylor et al., 2007).

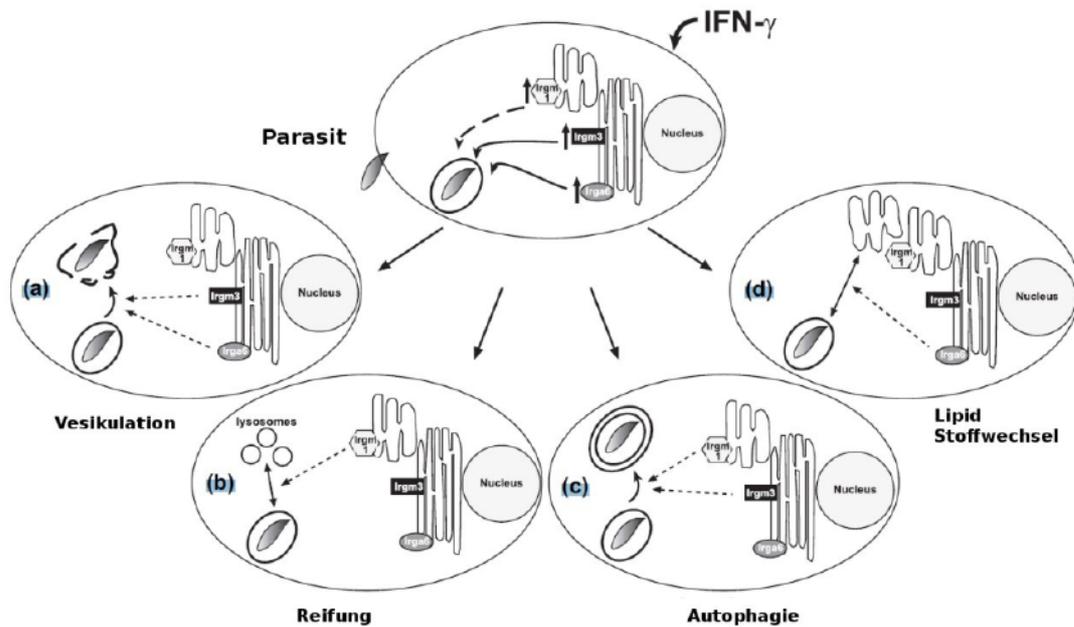


Abb. 5: Rolle der p47 GTPasen bei der Wirtzellabwehr gegen intrazelluläre Parasiten

Nach der Invasion des Parasiten in die Zelle lokalisieren die GTPasen an der entstandenen PV und führen dort zu: a) Abbau der PV durch Vesikulation, b) beschleunigter Reifung der PV sowie erhöhter Fusionsrate mit Lysosomen, c) Eliminierung des Parasiten durch Induktion von Autophagie d) Modulation des Lipidtransports vom Golgiapparat zur PV (verändert nach (Taylor et al., 2007)).

3 Fragestellung der Arbeit

T. gondii ist als obligat intrazellulärer Parasit in der Lage, ein breites Spektrum von Zellen zu infizieren, wodurch eine Vielzahl von Abwehrmechanismen induziert wird.

Ein erst in jüngster Zeit beschriebener IFN- γ abhängiger Abwehrmechanismus ist die Induktion der p47 GTPasen. Diese nach ihrem Molekulargewicht benannten GTPasen sind essentiell für die Immunabwehr von *T. gondii*. Die p47 GTPasen IIGP und IGTP lokalisieren an der Toxoplasmenmembran und spielen eine entscheidende Rolle bei der Zerstörung der PV und Autophagie des Parasiten. Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Rekrutierung der p47 GTPase IIGP bei dem virulenten Toxoplasmenstamm BK im Vergleich zu dem avirulenten Toxoplasmenstamm ME49 stark erniedrigt ist. In der hier vorliegenden Arbeit sollte das Rekrutierungsverhalten der p47 GTPase IIGP an die PV weiterer virulenter und avirulenter Stämme untersucht werden. Zusätzlich sollte eine zweite p47 GTPase TGTP untersucht werden und mit dem Rekrutierungsverhalten von IIGP verglichen werden. Gleichzeitig sollte deren räumliche Lokalisation sowie eventuelle Kolokalisation an der PV untersucht werden. Die GTPasen Rekrutierung sollte des Weiteren mit der Signalintensität des Toxoplasmen-Proteins GRA7 an der PV in Bezug gesetzt werden, da in der PVM lokalisiertes GRA7 als Indikator für deren Integrität beschrieben wurde und somit ein Zusammenhang zwischen GTPasen Rekrutierung und Eliminierung des Parasiten hergestellt werden kann.

Die beobachtete verminderte GTPasen-Rekrutierung virulenter Toxoplasmen führte im folgenden Teil dieser Arbeit zu der Fragestellung, ob die GTPasen-Rekrutierung avirulenter Toxoplasmen von virulenten beeinflusst wird. Dies sollte durch Koinfektionsexperimente in denen beide Stämme, sowohl virulent als auch avirulent, die gleiche Zelle infiziert haben, untersucht werden. Mit diesem Experiment sollte geprüft werden, ob virulente Toxoplasmen die verminderte GTPasen-Rekrutierung durch Modifikation der Wirtszelle oder der einzelnen parasitophoren Vakuole erzielen.

ROP18 wird in der Literatur als Virulenzfaktor beschrieben. Die Expression des virulenten Allels in avirulenten Toxoplasmen führt zu einer erhöhten Mortalität in Mäusen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher unbekannt. Die p47 GTPasen sind ein fundamentaler Bestandteil der Abwehr von *T. gondii* in der Maus. Das ROP18-Protein sowie die p47 GTPasen lokalisieren beide an der zytosolischen Seite der PV, so dass eine Interaktion vorstellbar ist. Im letzten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ROP18 für die verminderte GTPasen-Rekrutierung virulenter Toxoplasmen mitverantwortlich ist. Dies sollte durch die Expression des virulenten ROP18-Proteins in avirulenten Toxoplasmen untersucht werden. Hierfür wurden avirulente Toxoplasmen mit dem virulenten Allel von ROP18

transfiziert und die Rekrutierung der p47 GTPasen IIGP und TGTP im Vergleich zum Wildtyp und zu virulenten Toxoplasmen beobachtet.

II Material

1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad *pro analysis* soweit dieses nicht anders vermerkt wurde. Zum Ansetzen von Lösungen wurde hochreines Wasser (dH₂O) aus der Anlage (Milli-Q System A10, Millipore GmbH, Schwalbach) verwendet.

Accutase	PPP-Laboratories, Pasching
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Betaplate Scintillationsflüssigkeit	Fisher Chemicals, Loughborough, UK
CD11b MicroBeads Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Chloramphenicol	Sigma, St. Louis, USA
4,6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochloridhydrat (DAPI)	Roche Biochemicals, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, USA
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA); Zellkultur getestet	Sigma, St. Louis, USA
Fluoromount-G	SBA, Birmingham, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Cambrex, Verviers, Belgien
Glutamin (200 mM)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Isopropanol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA), Zellkultur getestet	Sigma, St.Louis, USA
Saponin	Sigma, St.Louis, USA

Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, St.Louis, USA
Tween-20	Merck, Darmstadt

2 Medien und Puffer

Dulbecco's modified Eagles's medium
(DMEM) ohne Phenolrot, 1g Glukose

Gibco Invitrogen, Karlsruhe

Iscove's modified Dulbecco's medium
(IMDM)+ 25 mM HEPES, ohne Glutamin

Cambrex, Verviers, Belgien

Hirnzell-Medium: DMEM

2 mM Glutamin
10 % (v/v) FCS
50 µM β-Mercaptoethanol

Zellkultur-Medium: IMDM

2 mM Glutamin
5 % (v/v) FCS
50 µM β-Mercaptoethanol

PBS/BSA/Saponin:

PBS
1 % BSA
0,1 % Saponin

FACS-Puffer:

PBS
2 % (v/v) FCS
0,05 % (w/v) Natriumazid
steril filtriert

MACS-Puffer:

PBS
0,5 % (w/v) BSA
5 mM EDTA

Lysis Puffer:	entgast, steril filtriert PBS 140mM NaCl 5mM MgCl ₂ 20mM Tris HCl
Lysogeny Broth (LB)-Medium:	Invitrogen
LB-Agar:	Invitrogen
5x DNA-Probenpuffer:	30 % (v/v) Glycerin 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylenxyanol in TAE-Puffer
Tris-Acetat-EDTA-Puffer:	40 mM Tris (TAE-Puffer) 20 mM Natrium-Acetat 1 mM EDTA pH 8,5
Elektrophorese-Puffer:	25 mM Tris 250 mM Glycerin 0,1 % (v/v) SDS pH 8,3
Kathoden-Puffer:	25 mM Tris 40 mM 6 – Aminohexansäure 20 % Methanol
Anode-I-Puffer:	30 mM Tris 20 % Methanol
Anode-II-Puffer:	300 mM Tris 20 % Methanol
Milchpulver-Lösung:	10% (w/v) Milchpulver in PBS

Paraformaldehyd	PBS 3%(w/v) Paraformaldehyd pH 8,0
Cytomix	KCl 120 mM CaCl ₂ 0,15 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , 10 mM pH 7,6 HEPES, 25 mM pH 7,6 EDTA 2 mM MgCl ₂ 5 mM ATP, frisch zugegeben 2 mM Glutathion, frisch zugegeben 5 mM

3 Antibiotika

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert	25 µg/ml

4 Proteine

4.1 Antikörper

Primärantikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Quelle/Referenz
anti-c-myc	Maus anti-c-myc	1:500	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-c-myc	Ratte anti-c-myc	1:500	Serotec, Düsseldorf
anti-YFP	Rabbit anti-YFP	1:2000	Abcam, Cambridge, USA
anti-GRA7 (5-241-178)	Maus anti-GRA7	1:3000	Abott, Illinois, USA
anti-GRA7 (BATO 214)	Maus anti-GRA7	1:5000	Jacobs et al. (1998)

anti-IIGP1	Kaninchen anti-IIGP	1:2000	Jonathan Howard, Köln
anti-ROP 2,3,4 (T3 4A7)	Maus anti-ROP	1:1000	Eurogentech
anti-SAG1 (GII9)	Maus anti-SAG1	1:1000	Innogenetics, Gent, Belgien
anti-TGTP	Ziege anti-TGTP	1:400	Santa Cruz

Sekundärantikörper:

Bezeichnung	Spezifikation	Verdünnung	Quelle/Referenz
anti-Kaninchen-Cy2	Ziege anti-Kaninchen IgG	1:200	Jackson, West Grove, USA
anti-Kaninchen-Bio	Esel anti-Kaninchen IgG	1:500	Jackson, West Grove, USA
anti-Kaninchen-HRP	Ziege anti-Kaninchen IgG	1:4000	Southern Biotec, USA
anti-Kaninchen-TRITC	Ziege anti-Kaninchen IgG	1:200	Jackson, West Grove, USA
anti-Maus-TRITC	Ziege anti-Maus IgG	1:200	Jackson, West Grove, USA
anti-Maus-FITC	Ziege anti-Maus IgG	1:200	Jackson, West Grove, USA
anti-Maus-POX	Ziege anti-Maus IgG	1:5000	Jackson, West Grove, USA
anti-Ratte-FITC	Ziege anti-Ratte IgG	1:200	Jackson, West Grove, USA
anti-Ziege Cy3	Esel anti-Ziege IgG	1:200	Jackson, West Grove, USA
anti-Ziege Cy3	Kaninchen anti-Ziege IgG	1:200	Jackson, West Grove, USA
FITC Streptavidin	Biotin	1:200	BD Pharmingen

4.2 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammen von der Firma Fermentas St. Leon-Roth und wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

Restriktionsenzym	Restriktionspuffer	Erkennungsstelle
<i>EcoRV</i>	Rot	5'-G A T [^] A T C-3' 3'-C T A [^] T A G-5'
<i>BglII</i>	Orange	5'-A [^] G A T C T-3' 3'-T C T A G [^] A-5'
<i>AvrII</i>	Gelb	5'-C [^] C T A G G-3' 3'-G G A T C [^] C-5'
<i>BglI</i>	Orange	5'-G C C N N N N [^] N G G C-3' 3'-C G G N [^] N N N N C C G-5'

4.3 Sonstige Enzyme

DNase I	Roche, Mannheim
Expand-High-Fidelity-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma, St. Louis, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Roche, Mannheim

4.4 Zytokine

rekombinantes murines Interferon- γ	BD Pharmingen, Heidelberg
--	---------------------------

5 Nukleinsäuren

1kb plus DNA-Leiter	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
peqGold DNA-Leiter Mix (100 bp – 10000 bp)	Peqlab, Erlangen, Deutschland

5.1 Vektoren

pCRII-TOPO-TA-Klonierungsvektor	3973bp	Invitrogen, Karlsruhe
pTub+YFP-Expressionsvektor	9289bp	Boris Striepen, Athens, USA
pTub+c-myc-Expressionsvektor	7821bp	Boris Striepen, Athens, USA
pTub+c-myc+ROP18 ^{BK}	9480bp	in dieser Arbeit erzeugt

5.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Primersequenz
CAT-for	5'TGC CCG CCT GAT GAA TGC TC3'
CAT-rev	5'GCC CCG CCC TGC CAC TC3'
YFP-for	5'ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG3'
YFP-rev	5'CGA TGG GGG TGT TCT GCT GGT AGT'3
HH32iv-for	5'TAT AGA TCT ATG TTT TCG GTC CAG CGG C3'
HH32iv-rev	5'ACC CCT AGG TTC TGT GTG AAG ATG TTC C3'

5.3 Nukleotide

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Peqlab, Erlangen
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP)	Peqlab, Erlangen
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP)	Peqlab, Erlangen
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)	Peqlab, Erlangen

Aus den oben gelisteten Nukleotiden wurde eine dNTP Stammlösung (je 10 mM) vorbereitet.

[5,6- ³ H]-Uracil	Hartmann Analytical, Braunschweig
------------------------------	--------------------------------------

6 Organismen

6.1 Bakterien

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	supE44, Δ lacU169, (Φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Hanahan, 1983

6.2 Zelllinien

humane Fibroblasten-Linie HS27
murine Fibroblastenzelllinie L929

Suss-Toby et al., 1996; ATCC Manassas USA
Sanford et al., 1948; ATCC, Manassas, USA

6.3 Toxoplasmen

BK	(WINSSER et al., 1948)
RH-YFP	(Gubbels et al., 2003)
ME49	(Parmley et al., 1994b; Parmley et al., 1994a)
NTE	(Gross et al 1995)
76K	(Dubremetz et al., 1994)

6.4 Mäuse

In dieser Arbeit wurden ausschließlich neugeborene Mäuse (0-2 Tage) des Inzuchtstammes C57BL/6 verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchanlage Düsseldorf gezüchtet und unter spezifischen, keimfreien Bedingungen gehalten. Jeglicher Umgang mit den Tieren wurde stets unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes vorgenommen.

7 Laborbedarf

Cup-Filcon	BD Biosciences, Heidelberg
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Dassel
Glasfaserfilter	Wallac, Turku, Finnland
Kanülen	BD Pharma, Heidelberg
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Transfektionsküvetten	Amaxa, Köln
Parafilm M	P. Plastik Packaging, Chicago, USA
Sample Bag	Wallac, Helsinki Finland
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Sterilpipetten	Corning Inc., New York, USA
Zellkulturflaschen	Corning Inc., New York, USA
Zellkulturplatten	Corning Inc., New York, USA
Zellsiebe 70 µm, 40 µm Nylon	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen

7.1 Kits

Endotoxin Free Plasmid Purification Kit

BD Biosciences, Heidelberg

Plasmid-DNA Minipreparation Kit

QIAGEN, Hilden

PCR-Purification Kit

Roche, Mannheim

Rapid DNA Ligation Kit

Roche, Mannheim

TOPO TA Cloning® Kit

Invitrogen, Karlsruhe

8 Geräte

Analysenwaage	Derlikon, Zürich, Schweiz
Basic 96 Harvester	Zinsser Analytic, Ebersbach/Frankfurt
Betaplate Liquidscintillationcounter	LKB Wallac, Helsinki, Finnland
Binokular-Mikroskop	Zeiss, Jena
CO ₂ -begaster Brutschrank	Kendro, Hanau
DNA/RNA Calculator II	Amersham, UK
ELISA-Photometer	Tecan, Grödig, Österreich
Electro Cell Manipulator Genepulser II	Biorad, Hercules, USA
Elektroporation	Biorad, Hercules, USA
Fluoreszenz-Mikroskop eclipse TE2000S	Nikon, Düsseldorf
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch, Salzgitter
Gefrierschrank (-80°C)	Revco, Asheville, USA
Heizblöcke	Techne, Cambridge, UK
Kühlschrank	Bosch, Salzgitter
Konfokales Mikroskop LSM	Zeiss, Jena
Magnetrührer	IKA, Staufen
Pipett-Boy	IBS, Chur, Schweiz
Sterile Werkbank (Clean-air)	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Thermocycler (PCR Express Gradient)	Hybaid, Deutschland
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen
Ultrazentrifuge (Optima L-60)	Beckmann, München
Vortexer	IKA, Staufen
Waage (Precisa 600)	Oehmen Labortechnik, Essen
Wasseranlage (Milli-Q System)	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge (Rotanta 96 RC)	Hettich, Tuttlingen

9 Software

Laser-Scanning-System 510	Zeiss, Jena
Lucia Image 4.8.1	Nikon, Düsseldorf
Microsoft Office (Excel, Word)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Prism 4	GraphPad Soft. Inc., San Diego, USA

Easy-Win-Fitting

Tecan, Grödig, Österreich

Gene Construction Kit 2.5

Textco, Inc New Hampshire, USA

Photoshop CS2

Adobe Systems Incorporated, San Jose USA

III Methoden

1 Zellkultur

1.1 Kultur von Zelllinien

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 10% (v/v) CO₂ kultiviert. Der Brutschrank wurde in dreimonatigen Intervallen gereinigt und desinfiziert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank und ausschließlich mit sterilen Materialien durchgeführt. Angesetzte Lösungen wurden mit Hilfe eines 0,22 µm Filter steril filtriert.

1.1.1 L929 Fibroblasten

Die murine Fibroblastenzelllinie L929 diente als Wirtszelle für die virulenten RH-YFP und BK Toxoplasmen-Stämme. Diese Zelllinie ist schnell wachsend und weist keine Kontaktinhibition auf.

Innerhalb von 3-4 Tagen bildete sich in der Zellkulturflasche ein konfluenten Zellrasen (Monolayer), die Zellen wurden entsprechend mittels Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und anschließend für 10 min bei 4°C mit 300 x g zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in einer Zählkammer ausgezählt. 1×10^6 Zellen wurden zum Passagieren in eine kleine 25 cm² Zellkulturflasche mit 5 ml Zellkulturmedium ausgesät.

1.1.2 HS27 Fibroblasten

Für die avirulenten ME49, NTE und 76K Toxoplasmen-Stämme diente die humane Fibroblastenlinie HS27, welche kontaktinhibiert und stark adhärent wächst, als Wirtszelle.

Innerhalb von 7 Tagen bildete sich in der Zellkulturflasche ein konfluenten Monolayer. Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurde, nach vorherigem Waschen mit PBS, Trypsin/EDTA verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 2 min im Brutschrank wurden 10 ml Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen wurden für 10 min mit 300 x g bei 4°C

abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert, in einer Zählkammer gezählt und anschließend auf die dreifache Fläche in Zellkulturflaschen neu ausgesät. Des Weiteren wurden die Zellen für die Immunfärbungen auf 22x22 mm großen Deckgläschen in 6-Well-Platten ausgesät.

1.2 Präparation und Kultur von murinen primären Gliazellen

Für die gesamte Präparation und Verarbeitung der Gliazellen wurden aufgrund der geringeren Adhärenz ausschließlich Plastikpipetten benutzt. Hirnzellmedium und MACS-Puffer waren eisgekühlt. Alle Präparationen wurden zügig, und stets auf Eis, durchgeführt, um den Verlust an Hirnzellen zu minimieren.

1.2.1 Präparation von Gliazellen aus neonatalen Mäusen

Zur Präparation von Gliazellen wurden neonatale Mäuse im Alter von 0 bis 2 Tagen verwendet. Nach Tötung der neugeborenen Mäuse in CO₂ gesättigter Atmosphäre wurden sie für 30 sec in 80% Ethanol überführt. Anschließend wurden die Mäuse dekapitiert und die Schädelkalotte vorsichtig eröffnet. Das Gehirn wurde komplett entnommen und in seine beiden Kortexhälften zerlegt. Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurden nun sorgfältig die Hirnhäute entfernt und jeweils 6 Kortexhälften in 3 ml DMEM ohne Phenolrot aufgenommen. Mit Hilfe eines Bunsenbrenners wurden Pasteurpipetten mit immer enger werdendem Lumen erzeugt, die zur mechanischen Zerkleinerung der Kortexhälften dienten. Nach Erreichen einer homogenen Suspension wurde diese auf 10 ml mit DMEM aufgefüllt und über ein 70 µm Zellsieb gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4°C für 10 min mit 300 x g zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in Hirnzellmedium aufgenommen und je 1x10⁶ Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät.

Nach 2 Tagen waren die überlebenden Zellen ausreichend adhärent, um einen Mediumwechsel durchzuführen, bei dem ein Großteil der abgestorbenen Zellen entfernt wurde. Im Anschluss daran wurde alle 2 Tage ein Mediumwechsel vollzogen, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten.

1.2.2 CD11b⁺ Mikroglia Depletion

Mittles MACS Depletion sollten aus der primären Gliakultur möglichst viele Mikrogliazellen entfernt werden, um eine reine Astrozyten Hirnzellkultur (HZK) zu erlangen.

Das Prinzip des Magnetic Cell Sortings (MACS) basiert auf kolloidalen superparamagnetischen Microbeads, die mit einem Mikroglia-Ak (CD11b⁺) konjugiert sind. Diese bleiben in einer Säule, die sich in einem Magnetfeld befindet, hängen und trennen so die Mikroglia von der restlichen Kultur.

10 Tage nach Präparation der primären Gliakultur wurde diese geerntet und mit CD11b Microbeads inkubiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gespült und durch 0,5 ml des Enzyms Akkutase vom Boden der 6-Well-Platte gelöst. Nach ca. 2 min Einwirkzeit im Brutschrank bei 37°C wurden nun 2 ml Hirnzellmedium pro Well hinzugegeben, um die Wirkung des Enzyms zu stoppen. Anschließend wurde mit Hilfe eines Zellschabers sorgfältig der Boden der 6-Well-Platte abgeschabt, damit möglichst alle Zellen in Suspension gelangten. Diese Zellsuspension wurde mittels Transferpipette in ein Röhrchen überführt und bei 300 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in MACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert, über ein 40 µm Zellsieb filtriert, und es wurde eine Probe zum bestimmen der Zellzahl entnommen. Im Anschluss wurde erneut bei 300 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und für 1×10^7 Zellen 180 µl MACS-Puffer und 20 µl CD11b Microbeads hinzugegeben. Nach 15 min Inkubationszeit im Kühlschrank bei 4°C wurden die nicht gebundenen Microbeads mit dem 10-fachen Volumen an MACS-Puffer ausgewaschen und bei 300 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden die MACS-Säulen am Magneten befestigt und mit 500 µl MACS-Puffer durchgespült. Das zentrifugierte Zellpellet wurde in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und über die Säule gegeben. Durch das Magnetfeld wurden die Microbeads und die an sie gebundenen Mikroglia in der Säule zurückgehalten. Der Durchfluss enthielt die CD11b negativen Astrozyten. Dieser wurde in 2 ml Hirnzellmedium aufgefangen, gezählt und nochmals bei 300 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 6×10^5 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte, 1×10^5 Zellen in eine 48-Well-Platte und 3×10^4 in eine 96-Well-Platte ausgesät. Des Weiteren wurden die Zellen für die Immunfärbungen auf 22x22 mm großen Deckgläschen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach einer Woche waren die Zellen konfluent gewachsen und standen für weitere Experimente zur Verfügung.

1.3 Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

1.3.1 Virulente Toxoplasmen

Für die Kultur von BK und RH-YFP Toxoplasmen wurden L929 Fibroblasten verwendet. Nach erfolgter Infektion dauerte es ca. 2-3 Tage bis der L929 Monolayer komplett durchlysiert war, und die Toxoplasmen somit frei im Überstand schwammen. Der Überstand wurde aus der Zellkulturflasche entnommen und in einem ersten Schritt bei 50 x g für 5 min bei 22°C zentrifugiert. Im so entstandenen Pellet befanden sich die Reste der Wirtszellen. Der toxoplasmenhaltige Überstand wurde in einem zweiten Schritt erneut mit 600 x g für 15 min bei 22°C zentrifugiert, so dass sich diesmal die abzentrifugierten Toxoplasmen im Pellet befanden. Deren Anzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Für die weitere Passage erfolgte die Überführung von 1×10^7 Parasiten in eine kleine Zellkulturflasche mit frischem Zellkultur-Medium, für welches im Fall der RH-YFP Toxoplasmen chloramphenicolhaltiges (20 μ M) Medium verwendet wurde, um den ständig vorherrschenden Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

1.3.2 Avirulente Toxoplasmen

HS27 Fibroblasten dienten als Wirtszellen für die Kultur von ME49, NTE und 76K. Nach ca. 3 Tagen waren die Parasiten aus den Wirtszellen ausgestiegen und befanden sich frei im Überstand. Dieser wurde abgenommen und bei 50 x g für 5 min bei 22°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, und der Überstand wurde erneut mit 600 x g für 15 min bei 22°C zentrifugiert. Nach dem Zählen der Toxoplasmen wurden 3×10^6 Parasiten mit frischem Medium in eine Zellkulturflasche mit konfluentem HS27 Monolayer überführt.

1.3.3 Transfizierte Toxoplasmen

Die beiden Klone 6.5.1 und 6.5.3 der ME49 ROP18^{BK} Transfektanten wurden, wie avirulente Toxoplasmen, in HS27 Fibroblasten kultiviert. Nach ca. 2-3 Tagen war der HS27 Monolayer komplett durchlysiert, und der toxoplasmenhaltige Überstand wurde wie oben bereits beschrieben in zwei aufeinander folgenden Schritten abzentrifugiert. Die Passage der Toxoplasmen erfolgte mit 20 μ M chloramphenicolhaltigem Medium, um den ständigen

Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Es wurden 4×10^6 Parasiten in eine Zellkulturflasche mit frischem Zellkulturmedium überführt.

1.3.4 Einfrieren und Auftauen von Toxoplasmen

Das Auftauen von im flüssigen Stickstoff gelagerten Toxoplasmen erfolgte in einem auf 37°C vorgewärmtem Wasserbad. Kurz vor dem vollständigen Auftauen der Probe wurde diese mit einer Transferpipette in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Zellkulturmedium überführt und bei $300 \times g$ für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde der DMSO-haltige Überstand abgesaugt und das Pellet mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die entsprechenden Wirtszellen mit der 3-fachen Menge der sonst zum Passagieren verwendeten Toxoplasmeninfektion infiziert.

Um Toxoplasmen einzufrieren wurde ein Gemisch aus 50% Zellkulturmedium und 40% FCS + 10% DMSO verwendet. Je nach Toxoplasmen-Stamm wurden 1×10^7 bis 5×10^7 Parasiten geerntet und in 1 ml eiskaltem Einfriergemisch in einem Kryoröhrchen aufgenommen. Danach wurden die Parasiten langsam auf -80°C abgekühlt und nach 24 h in flüssigem Stickstoff gelagert.

2 Toxoplasmen-Proliferationstests

Die intrazelluläre Proliferation von Toxoplasmen kann zum einen mikroskopisch, zum anderen anhand des ^3H -Uracil Einbaus, gemessen werden.

Toxoplasmen sind im Vergleich zu Säugetierzellen in der Lage, exogenes Uracil für die Nukleotidsynthese zu benutzen. Dies liegt an der erhöhten Aktivität des Enzyms Uridin-Phosphorylase, welches im Vergleich zur Wirtszelle um das 100-fache gesteigert ist (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977).

Die Testansätze wurden als Triplikate der einzelnen Versuchsbedingungen sowohl in 96-Well-Platten mit 3×10^4 als auch in 48-Well-Platten mit 1×10^5 Astrozyten pro Well durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h vor Infektion mit unterschiedlichen IFN- γ Konzentrationen (0,10,100,1000 U/ml) vorstimuliert. Anschließend erfolgte die Infektion mit Toxoplasmen in einem Parasit/Wirtszellverhältnis von 1:1 und 0,3:1. Nach zweitägiger Kultivierung im Brutschrank bei 37°C wurden die Platten mit ^3H -Uracil (0,037 MBq/Well) radioaktiv markiert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen bei -20°C eingefroren, um eine Freisetzung von DNA durch

Zellruptur zu erzielen. Nach dem Wiederauftauen der Zellen wurden die Testansätze aus den 48-Well-Platten in je zwei 96-Well-Platten überführt und dreimal mit 0,1% SDS-Lösung nachgespült. Das Ernten der 96-Well-Platten geschah mittel eines Zellerntegerätes (Basic 96 Harvester), wobei der Inhalt der Platten auf einen Glasfaserfilter übertragen wurde, welcher im Anschluss für 10 min bei 100°C in einem Trockenschrank komplett getrocknet wurden. Danach wurde der Glasfaserfilter zusammen mit ca. 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Betaplate Scint) in eine Plastikfolie eingeschweißt und die Radioaktivität im Betaplate Liquidszintillationcounter gemessen. Die gemessenen „counts per minutes“ (cpm) entsprachen der eingebauten Radioaktivität und korrelierten mit der Toxoplasmenproliferation. In den Grafiken repräsentieren die Fehlerbalken die Triplikat-Mittelwerte \pm der Standardabweichung.

3 Immunfluoreszenz

3.1 Präparate

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden Astrozyten auf 22x22 mm große Deckgläschen in 6-Well-Platten ausgesät. Nach ca. sieben Tagen bildeten die Zellen einen konfluenten Monolayer und wurden 24 h vor Infektion mit IFN- γ (100 U/ml) stimuliert. Die 15-minütige Pulsinfektion erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit frisch ausgestiegenen und geernteten Toxoplasmen; bei einer Infektionsdosis von 1×10^7 Toxoplasmen pro Deckgläschen. Nach Ablauf der Pulsinfektion wurden, um alle nicht eingestiegenen Toxoplasmen abzuwaschen, die Deckgläschen dreimal gründlich mit PBS gespült. Anschließend wurde, je nach Infektionsdauer, die Inkubation mit frischem Medium fortgesetzt. Zu gegebenen Inkubationszeitpunkten (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h) wurde die Infektion gestoppt, indem die Zellen mit 3% Paraformaldehyd für 15 min fixiert wurden. Danach wurden die Deckgläschen erneut zweimal mit PBS gewaschen und dann in 2 ml PBS pro Well für die spätere Immunfärbung im Kühlschrank gelagert.

3.2 Immunfärbung

Die fixierten Zellen wurden zunächst für 1 h permeabilisiert und geblockt. Hierzu wurden je 2 ml Blocklösung (PBS mit 1% BSA und 0.1% Saponin) pro Well auf die Präparate gegeben.

Das bovine Serumalbumin (BSA) diente zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. Nach Zugabe der Blocklösung wurden die Präparate 1 h mit 100 µl der Primär-Ak-Lösung in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit je 2 ml PBS + 0,1% Saponin pro Well. 100 µl der Sekundär-Ak-Lösung wurden für 1 h auf die Präparate appliziert und nachfolgend erneut dreimal gewaschen. Bei Sekundär-Ak, die nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, sondern biotinyliert gewesen sind, erfolgte ein dritter Färbeschritt mit einem fluoreszenzmarkierten Streptavidin-Ak. Im letzten Färbeschritt erfolgte die Kernfärbung mit DAPI (4 µg/ml) für 5 min mit zwei darauf folgenden Waschschriffen. Die fertig gefärbten Präparate wurden nun kurz in dH₂O getaucht und mit Hilfe von 40 µl Fluoromount-G Eindeckmedium auf Objektträger überführt, welche über Nacht im Kühlschrank getrocknet und am nächsten Tag ausgewertet wurden.

3.3 Mikroskopische Auswertung der Präparate

Zur Quantifizierung der GTPasen-Rekrutierung wurden jeweils drei unabhängige Experimente mit sieben unterschiedlich fixierten Zeitpunkten (15 min-24 h) ausgewertet, wobei zu jedem Zeitpunkt zwei Deckgläschen untersucht wurden. Auf jedem Deckgläschen wurden mindestens 100 PV mit den dazugehörenden Zellkernen und rekrutierten GTPasen gezählt. Die Anzahl der Toxoplasmen und der PV wurde entweder mittels GRA7-Ak oder mittels DAPI Kernfärbung ausgezählt. In den Grafiken repräsentieren die Fehlerbalken die Mittelwerte ± der Standardabweichung.

4 Herstellung ROP18 transfizierter Toxoplasmen

Hierzu wurde aus virulenten BK Toxoplasmen das ROP18 Allel isoliert und in avirulente ME49 Toxoplasmen kloniert.

4.1 Präparation genomischer DNA aus Toxoplasmen

Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurden 5×10^7 Toxoplasmen eingesetzt. Nach der Ernte wurden die Toxoplasmen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 300

μ l Lysepuffer versetzt. Hierzu wurde 100 μ g/ml Proteinase K frisch hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei 50°C auf dem Schüttler inkubiert.

Um die Proteine aus der wässrigen Lösung zu fällen, wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Der Ansatz wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform versetzt und auf einem Vortex vermischt. Anschließend wurde das Gemisch für 3 min mit 10000 x g bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der so abgetrennte wässrige Überstand wurde abgenommen und so lange extrahiert, bis keine Interphase mehr sichtbar war.

Die extrahierte DNA wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und dann mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol vermischt und für 30 min bei -20°C gefällt. Danach wurde die Probe sofort 30 min mit 20000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die übrig gebliebene DNA mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und abschließend in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Generierung und Amplifikation von DNA-Fragmenten mit passenden Schnittstellen für den Amplifikations- sowie Expressionsvektor wurden PCR-Reaktionen in einem Thermocycler durchgeführt.

Während eines Amplifikationszykluses kommt es zur Denaturierung der Template-DNA, wodurch die Anlagerung spezifischer Primer ermöglicht wird. Jetzt erfolgt die Synthese der komplementären DNA zwischen den angelagerten Primern durch die Polymerase. Durch die temperaturgesteuerte wiederkehrende Abfolge von Denaturierung und Synthese kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Sequenz zwischen den Primern.

Ein 25 μ l PCR-Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

	Stammkonzentration	Eingesetzte Menge
PCR-Puffer	10x	2,5 μ l
MgCl ₂	50 mM	0,75 μ l
dNTPs	10 mM	0,5 μ l
Primer-for.	20 μ M	0,5 μ l
Primer-rev.	20 μ M	0,5 μ l
Taq Polymerase	5 U/ μ l	0,25 μ l
DNA	10-200 ng	1 μ l
H ₂ O		19 μ l
Endvolumen		25 μ l

Zur Herstellung von DNA-Fragmenten für Vektorkonstrukte wurde eine spezielle Polymerase Expand High Fidelity (Roche) mit „proof reading“ Aktivität verwendet. Um die ROP18 Sequenz nach Amplifikation in den Expressionsvektor zu ligieren, mussten am 3' und 5' Ende der Sequenz spezielle Schnittstellen angefügt werden. Diese Schnittstellen wurden mit Hilfe von überhängenden Primern generiert. Anschließend konnten so PCR-Produkt und Vektorkonstrukt mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und dadurch die nachfolgende Ligation ermöglicht werden.

Die Amplifikation lief im Thermocycler (PCR Express Gradient, Hybaid) nach folgendem Schema ab:

Denaturierung	5 min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	95°C	
Annealing	1 min	60°C	35 Zyklen
Elongation	1 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

4.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten (Agarose Gelelektrophorese)

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele mit 1% Agarose in TAE-Puffer verwendet (Maniatis et al. 1989). Nach Aufkochen des Agarosegels wurde dieses mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die PCR-Proben wurden mit 0,2-fachen Volumen 5-fach DNA-Probenpuffer versetzt und auf das auspolymerisierte Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte die Auftrennung bei 6 V/cm in einer horizontalen Gelkammer. Als Puffer diente TBE. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel mittels Ethidiumbromid lokalisiert. Durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (340 nm) emittierten die in der doppelsträngigen DNA interkalierenden Ethidiumbromidmoleküle Licht im sichtbaren Bereich (590 nm). Die Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (BioDocAnalyse von Biometra).

4.4 Isolation und Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel

Zur Aufreinigung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente wurden diese unter nur schwacher UV-Beleuchtung im Gel lokalisiert. Diese Gele wurden nicht der normalen

Fotodokumentation unterzogen, da die starke UV Bestrahlung die aufzureinigende DNA hätte schädigen können. Nach zügiger Lokalisation der DNA-Bande wurde diese nun vorsichtig mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel ausgestochen. Die DNA aus dem Gel-Fragment wurde mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche nach Herstellerangaben eluiert. Anschließend wurde die DNA in 50 µl Tris-HCl 10 mM pH 8,5 aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme gehören zu den Typ II Endonukleasen. Sie erkennen spezifische pallindromische Erkennungssequenzen im Bereich von 4 bis 8 Basenpaaren der DNA. Durch Hydrolyse der doppelsträngigen DNA entstehen so genannte „klebrige“ Enden, welche sich zu Klonierungszwecken eignen.

Ein typischer Restriktionsansatz sah wie folgt aus:

H ₂ O	15 µl
10x Puffer	2 µl
Enzym 10 U/µl	1 µl
DNA 1 µg/µl	1-4 µl

Die Proben wurden für mindestens 60 min bei 37°C oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der Verdau auf einem Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch augetrennt. Zur Identifizierung der Größe einzelner Fragmente wurden entsprechende Marker mit aufgetragen.

4.5.1 Restriktionsverdau zur Kontrolle der Vektorkonstrukte

Um das Vorhandensein von DNA-Fragmenten in Vektorkonstrukten zu kontrollieren, wurden diese mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut. An Hand der sich ergebenden Anzahl und Größe der Fragmente konnte auf das Vorhandensein des Inserts geschlussfolgert werden.

Das Restriktionsenzym *EcoRV* wurde zur Kontrolle der Ligation des ROP18-Fragments in den Klonierungsvektor pCRII TOPO verwendet (Abb. 8). Zur Kontrolle des Ligationserfolges des ROP18-Fragments mit dem pTub+c-myc Vektor wurde das Restriktionsenzym *BglI* verwendet. Vektoren mit Insert wurden dreimal geschnitten (Abb. 10).

4.5.2 Restriktionsverdau für Ligationszwecke

Um eine Ligation mit dem Expressionsvektor zu ermöglichen, müssen sowohl das DNA-Fragment als auch der Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten werden, so dass die erzeugten „klebrigen“ Enden von Vektor und Insert sich aneinander anlagern können. Mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Avr*II wurde so zum einen das ROP18 PCR-Produkt mit den Primern bedingten Überhängen geschnitten, zum anderen der Expressionsvektor pTub+c-myc.

4.6 Ligation

4.6.1 Ligation mittels TOPO-TA-Cloning Kit

Um das PCR-Produkt in den Klonierungsvektor pCRII TOPO zu legieren, wurde das „TOPO-TA-Cloning-Kit“ benutzt. Dabei nutzt man die Eigenschaft der Taq Polymerase an amplifizierte DNA-Fragmente A-Überhänge zu generieren, die so in den mit T-Überhängen versehenen Klonierungsvektor legiert werden können. Die an den Vektor gebundene Topoisomerase verhindert die Religation des Vektors ohne Insert.

Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Zu 4 µl aufgereinigtem PCR-Produkt wurden je 1 µl Salzlösung und pCR-II-TOPO-Vektor gegeben. Anschließend wurde das Gemisch resuspendiert und 8 min bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt und in chemisch kompetente *E. coli* transformiert.

4.6.2 Ligation mittels T4 Ligase

Hierzu wurde der pTub+c-myc-Expressionsvektor und das PCR-Produkt zuvor mit *Bgl*III und *Avr*II Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend erfolgte Auftrennung und Aufreinigung aus dem Gel mit dem „PCR-Purification-Kit“.

Die Ligation erfolgte mit Hilfe des „Rapid DNA Ligation Kit“. Dieses Kit arbeitet mit der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4. Die Ligase verknüpft das 5`Phosphat mit dem 3`Hydroxylende linearer DNA.

Der Vektor und das PCR-Produkt wurden im Verhältnis von 1:4,6 vermischt und die DNA über Nacht gefällt. Das gefällte und getrocknete DNA-Pellet wurde in 10 µl „DNA dilution buffer“ aufgenommen und mit 10 µl zweifach „ligation buffer“ versetzt. Nach Zugabe von 1 µl

T4 Ligase wurde der Reaktionsansatz gut vermischt und für 4 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E.coli* Bakterien.

4.7 Transformation von *E.coli* Bakterien

Zur Transformation der ligierten Vektorkonstrukte wurden kompetente *E.coli* (DH5 α) verwendet. Nach langsamem Auftauen von 200 μ l Bakterien auf Eis wurden diese mit je 2 μ l des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der 30 min sollte sich der Vektor an die Bakterienmembran angelagert haben, um nun durch einen Hitzeschock aufgenommen zu werden. Der Hitzeschock erfolgte in einem 42°C warmen Heizblock für genau 90 sec. Danach wurde der Transformationsansatz sofort für 1-2 min auf Eis überführt. Anschließend wurden 500 μ l LB-Medium zu der Probe hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Inzwischen wurden die LB-Ampicillin-Platten im Brutraum vorgewärmt. Als nächstes wurden die Transformationsansätze unter der Sterilbank ausplattiert. Hierzu wurden mit einer sterilen Pipettenspitze pro Ligationsansatz je zwei Platten mit einmal 90% und einmal 10% des Transformationsansatzes ausplattiert. Die Platten wurden unter der Sterilbank getrocknet und über Nacht bei 37°C im Brutraum kopfüber inkubiert. Auf den Platten wuchsen nur Bakterien, die den Vektor aufgenommen hatten, da das Vektorkonstrukt für eine Ampicillinresistenz kodierte. Am nächsten Tag wurden einzeln gewachsene Kolonien in eine Übernachtskultur überimpft.

4.7.1 Haltung und Sicherung von Bakterienstämmen

Bei Arbeiten mit transformierten *E.coli* Bakterien (Klasse S1) muss unbedingt verhindert werden, dass diese Bakterien in die Umwelt gelangen, weshalb alle mikrobiologischen Abfälle vor Entsorgung autoklaviert wurden.

Nährböden und Kulturmedium wurden aus Trockenpulver der Firma Invitrogen hergestellt. LB-Medium wurde mit Ampicillin (100 μ g/ml) angesetzt. Die kurzfristige Sicherung der Bakterienstämme erfolgte auf LB-Agar Platten versehen mit Ampicillin (Amp) bei 4°C. Zur langfristigen Sicherung wurden in einem sterilen Stockgläschen 500 μ l Bakterienlösung mit 500 μ l 85% Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

4.8 Anzucht von Übernachtskulturen

Einzel wachsende Kulturen wurden von einer LB-Amp-Platte mit einer sterilen Pipettenspitze in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Amp-Medium überimpft, und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C im Brutraum inkubiert. Aus diesem trüb gewordenen Medium konnte nun am nächsten Tag direkt Plasmid-DNA präpariert werden. Für größere Mengen an Plasmid-DNA wurden am nächsten Morgen die 5 ml trübes Medium in 150 ml LB-AMP-Medium überführt, und die Bakterien wurden weitere 12-16 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

4.9 Gewinnung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid DNA (pDNA) wurde, je nach benötigter Menge, entweder eine Mini-Präparation mit 5 ml oder eine Maxi-Präparation mit 150 ml einer Übernachtskultur angesetzt. Das Verfahren der Plasmidgewinnung war bei beiden Methoden gleich. Die Präparation und Reinigung der pDNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Maxipräparation wurde das „Endotoxin Free Plasmid Purification Kit“ und für die Minipräparation das „Plasmid-DNA Minipreparation Kit“ verwendet.

4.9.1 Fällung von DNA

Um die DNA aus der wässrigen Lösung zu fällen wurde das 0,8-fache Volumen Isopropanol zur Probe hinzugegeben. Die Probe wurde gut vermischt und bei Raumtemperatur für 1 h bei 3900 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei RT für 60 min bei 3900 x g wurde das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet. Danach wurde es in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert. Hierauf erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung.

4.9.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung reiner DNA wurde mit Hilfe eines Photometers in einer Quarzküvette bei einer Absorption von 260 nm vollzogen. Die Kalibrierung des Photometers

erfolgte mit destilliertem Wasser. Um in einem linearen Messbereich zu arbeiten, wurden die Proben mit destilliertem Wasser so verdünnt, dass die Absorption in einem Bereich von 0,1 bis 1 lag. Nach Berechnung des Verdünnungsfaktors ergab sich vereinfacht folgende Formel zur Konzentrationsbestimmung:

$$1,0 A_{260} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$$

Um eine Aussage über Reinheit der Nukleinsäuren zu erlangen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Bei 280 nm wird die Absorption von Proteinen gemessen, die hier eine Verunreinigung darstellen. Aus dem Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm ließ sich auf die Reinheit der Probe schließen. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2, spricht man von einer reinen Probe. Bei Verunreinigungen liegt er deutlich niedriger.

4.10 Sequenzierung von DNA

Zur Kontrolle der korrekten ROP18 Sequenz, wurde je eine Probe nach Klonierung in den Klonierungsvektor und in den Expressionsvektor entnommen. Die Sequenzierung dieser Proben wurde von der Firma GATC durchgeführt.

4.11 Transfektion von Toxoplasmen

In der Literatur ist beschrieben, dass avirulente Toxoplasmen wesentlich schwieriger zu transfizieren sind als virulente (Striepen und Soldati, 2007). Die avirulenten Toxoplasmen wurden mittels Elektroporation transfiziert, da das hierbei verwendete Gerät (Electro Cell Manipulator Genepulser II) eine Vielzahl an manuellen Einstellungen zur Optimierung der Transfektion bot. Hierbei wird mit Hilfe elektrischer Impulse DNA in die Zelle eingebracht. Durch den elektrischen Impuls wird die Permeabilität der Zellmembran kurzzeitig erhöht, so dass die großen DNA Moleküle in die Zelle gelangen können. Der dabei erzielte Transfektionserfolg hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, wie beispielsweise von der angelegten Spannung, von der Dauer des elektrischen Impulses und von der vorherrschenden Temperatur. Des Weiteren ist die Ionenzusammensetzung des Elektroporationsmediums und letztendlich die Reinheit und Konzentration der zu transfizierenden DNA ausschlaggebend für eine hohe Transfektionsrate.

4.11.1 Transfektion mittels Elektroporation

Hierfür wurden Toxoplasmen geerntet, in Cytomix ohne ATP und Glutathion resuspendiert und in einer Zählkammer gezählt. Nach erneutem Zentrifugieren mit 600 x g für 15 min bei 22°C wurden pro Ansatz 1×10^7 Toxoplasmen in 800 µl Cytomix aufgenommen. Dieser Ansatz wurde nun in eine 2 mm Küvette überführt und mit 50 µg Vektor-DNA möglichst luftblasenfrei vermischt. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 2 kV, 50 Ω und mit 25 µF im Electro Cell Manipulator Genepulser II. Nach 15 min Ruhephase wurde je ein Transfektionsansatz in ein Well einer 6-Well-Platte mit 2 ml chloramphenicolhaltigem IMDM-Medium überführt.

Die Linearisierung der Vektor-DNA mittels des Restriktionsenzym *NotI* (50U) vor Transfektion der Toxoplasmen zeigte keine erhöhten Transfektionsraten.

4.12 Kontrolle der Transfektionsrate - Nachweis des Vektors

Nach Transfektion der Toxoplasmen mit dem Vektorkonstrukt wurden die Transfektanten zunächst in einer 6-Well-Platte kultiviert. Je nach Transfektionsansatz war der Monolayer der 6-Well-Platte nach ca. 2 Wochen durchlysiert und mindestens 3×10^6 Toxoplasmen zum Passagieren in eine kleine Zellkulturflasche vorhanden. Nachdem genügend Toxoplasmen in der Kultur von Zyklus zu Zyklus überlebten, wurden jeweils definierte Mengen zur Bestimmung der Transfektionsrate abgenommen.

4.12.1 Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Zur fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle der Transfektanten wurden HS27 auf 22x22 mm große Deckgläschen ausgesät und infiziert. Hierfür wurden ca. 1×10^6 Toxoplasmen pro Deckgläschen benötigt. Transfektanten mit dem Expressionsvektor pTub+c-myc+ROP18^{BK} wurden zur Visualisierung mit einem anti-c-myc Primär-Ak gefolgt von einem FITC-markierten Sekundär-Ak angefärbt, sowie einer Kernfärbung mit DAPI unterzogen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden nun 100 Toxoplasmen an Hand ihrer Zellkerne gezählt und anschließend von diesen der Anteil der FITC-positiven bestimmt. Diese Transfektionsrate wurde in regelmäßigen Abständen (ca. alle 4-6 Passagen) kontrolliert.

4.12.2 Western Blot

Um den Transfektionserfolg auf Proteinebene zu untersuchen, wurde ein Western Blot angefertigt.

4.12.2.1 Präparation von Toxoplasmenlysat

Das c-myc markierte ROP18-Protein sollte mittels Westernblot in den Transfektanten nachgewiesen werden. Hierzu wurden 2×10^7 frisch ausgestiegene Toxoplasmen geerntet und einmal in PBS gewaschen. Nach dem Zentrifugieren mit $600 \times g$ für 15 min bei 22°C wurden die Transfektanten in 80 μl Lysis-Puffer aufgenommen, fünfmal in flüssigem N_2 durchgefroren und anschließend wieder im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Durch das Gefrieren und Auftauen wurden alle Proteine durch Aufsprengen der Zellmembranen aus den Parasiten freigesetzt. Die Zugabe von Proteinaseinhibitor sollte vor dem Selbstverdau der Proteine schützen. Die Zellbruchstücke wurden bei 4°C für 10 min bei $10.000 \times g$ abzentrifugiert. Je 45 μl Überstand wurden nun mit 5 μl Probenpuffer (PP) versetzt und für 10 min in einem 100°C Heizblock inkubiert. Als Positiv-Kontrolle dienten c-myc positiv transfizierte HELA Zellen.

4.12.3.2 Auftrennen von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte mittels SDS-Page. Bei Natriumdodecyl-sulfat (SDS) handelt es sich um ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladung der Proteine so überdeckt, dass die Auftrennung im elektrischen Feld lediglich nach der Größe der Proteine erfolgt. Als Gel wurde NuPAGE Novex Tris-Acetat Mini Gel und als Größenstandard der Marker Sea Blue Plus 2 der Firma Invitrogen mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120V für 1 h.

4.12.3.3 Semi-dry-Transfer

Die Proteine aus dem Gel wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, was elektrophoretisch nach dem „Semy-dry“ Verfahren erfolgte (Kyhse-Anderson J., 1984). Hierzu wurden neun Filterpapiere in der Größe des Gels zugeschnitten und jeweils drei in Kathoden-Puffer, Anoden-I-Puffer und Anoden-II-Puffer gegeben. Nun wurden die drei Filterpapiere aus dem Kathodenpuffer auf die Kathodenplatte des Transferapparates gelegt, gefolgt von dem SDS Gel und der Nitrozellulosemembran. Die restlichen Filterpapiere aus

Anoden-I und II Puffer wurden sorgfältig auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Hierbei ist darauf zu achten, dass sich zwischen keiner der Lagen Luftblasen bilden, da an diesen Stellen sonst kein Strom fließt und somit auch keine Proteine auf die Nitrozellulosemembran gelangen. Als letztes wurde die Anodenplatte auf den Stapel platziert. Der Proteintransfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 2 h.

4.12.3.4 Immundetektion

Vor der Immunfärbung der übertragenen Proteine wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h in PBS + 3% Milchpulver + 0,05% Tween auf dem Schüttler inkubiert, was dem Absättigen unspezifischer Bindungen auf der Membran diente. Anschließend wurde die Membran mit dem Primär-Ak, gelöst in PBS + 3% Milchpulver, in eine Folie luftblasenfrei eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primär-Ak durch dreimaliges Waschen für jeweils 15 min mit PBS + 0,05% Tween entfernt. Dann wurde die Membran mit Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Ak bei RT für 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin erfolgte erneut dreimaliges Waschen für jeweils 15 min mit PBS + 0,05% Tween. Nun wurde die Membran mit Chemolumineszenzsubstrat „ECL Western-Blotting-Detection-Reagent“ für 5 min inkubiert. Um die Chemolumineszenz mittels Röntgenfilm (Kodak) zu detektieren, wurden Membran und Röntgenfilm zusammen in eine Röntgenkassette gelegt. Die Expositionszeit betrug zwischen 30 sec und 2 min. Die Entwicklung erfolgte in der Röntgenfilmentwicklermaschine „Curix 60“ von AGFA.

4.13 Monoklonisierung transfizierter Toxoplasmen

Nachdem eine stabile Kultur von 90% positiv transfizierten Toxoplasmen unter ständigem Chloramphenicol-Selektionsdruck erreicht wurde, sollte diese nun mittels der „limiting dilution“ Methode kloniert werden. Hierfür wurden HS27 Fibroblasten in 96-Well-Platten ausgesät. Nach dem Ernten und Zählen frisch ausgestiegener Transfektanten wurden diese so weit verdünnt, dass rechnerisch eine Infektionsdosis von 0,1 Parasiten pro Well resultierte. So konnte sichergestellt werden, dass die entstehende Population von nur einem einzelnen Parasiten abstammt. Nach 7-14 Tagen konnten in dem HS27 Monolayer erste Lysehöfe gesehen werden. Diese klonalen Linien wurden zuerst in 6-Well-Platten und später in kleinen Kulturflaschen weiter passagiert. Die ME49 (ROP18^{BK}) Klone 6.5.1, 6.5.2 und 6.5.3 wurden, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, auf das Vorhandensein des Proteins hin kontrolliert. Alle Linien und gemischte Populationen wurden standardmäßig unter Chloramphenicolselektion kultiviert.

IV Ergebnisse

1 Interferon- γ stimulierte Astrozyten hemmen *Toxoplasma gondii*

Es ist bekannt, dass INF- γ stimulierte Astrozyten in der Lage sind, avirulente ME49 Toxoplasmen zu hemmen. Um dies näher und für weitere Stämme zu untersuchen, wurden Infektionsexperimente sowohl mit virulenten als auch mit avirulenten *T. gondii* durchgeführt. Der in dieser Arbeit verwendete virulente RH Toxoplasmen-Stamm exprimiert konstitutiv „yellow fluorescent protein“ (YFP), das als fluoreszierendes Protein den Nachweis der Toxoplasmen im Fluoreszenzmikroskop ohne vorherige Ak-Färbung zulässt. Die Ergebnisse dieser Versuche ließen zwischen dem Wildtyp RH und den RH-YFP transfizierten Toxoplasmen keine Unterschiede erkennen (Daten nicht gezeigt).

1.1 Hemmung virulenter Toxoplasmen

Für die *T. gondii*-Stämme BK und RH konnte bereits ein nur sehr schwacher Hemmeffekt der Toxoplasmen-Proliferation durch INF- γ stimulierte Astrozyten gezeigt werden (Mai, 2006). Diese Ergebnisse konnten, wie in Abb. 6 zu erkennen ist, reproduziert werden.

Hierfür wurden murine Astrozyten mit unterschiedlichen INF- γ Konzentrationen inkubiert und anschließend mit BK und RH-YFP Toxoplasmen infiziert. Im Infektionsansatz ohne INF- γ Zugabe konnte die Proliferation ungehemmt ablaufen und wurde daher auf 100% Toxoplasmenwachstum gesetzt.

In Abb. 6 erkennt man für BK Toxoplasmen eine leichte Reduktion der Toxoplasmenproliferation bei Zugabe von INF- γ . Diese Reduktion beträgt maximal 10 – 20% und verstärkt sich nicht bei steigender INF- γ Konzentration. Bei den RH-YFP Toxoplasmen lässt sich eine ca. 25%ige Proliferations-Hemmung für die höchste INF- γ Dosis nachweisen. Zusammenfassend zeigt sich für virulente Toxoplasmen eine nur schwache Hemmung, bei maximaler INF- γ Dosis.

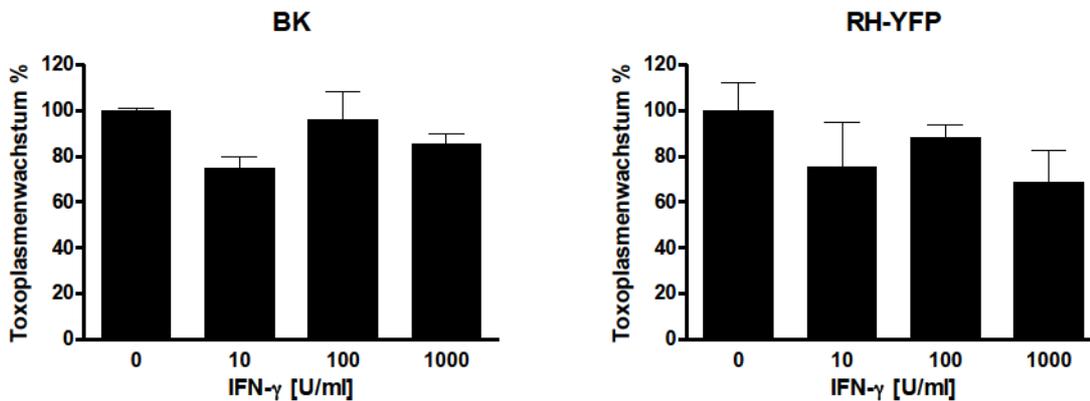


Abb. 6: Schwache Hemmung virulenter *T. gondii* durch murine Astrozyten

Murine Astrozyten wurden mit 10, 100 oder 1000 U/ml INF- γ vorstimuliert oder blieben unstimuliert. Nach Ablauf von 24 h erfolgte eine Infektion mit BK und RH-YFP Toxoplasmen in einem Toxoplasmen-Astrozyten-Verhältnis von 1:1. Die Toxoplasmen-Proliferation wurde anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem ^3HU gemessen. In unstimulierten Astrozyten kann die Toxoplasmen-Proliferation ungehindert ablaufen, dieser Wert entspricht deshalb 100% Toxoplasmen-Wachstum.

1.2 Hemmung avirulenter Toxoplasmen

Für den avirulenten ME49 Toxoplasmen-Stamm lässt sich in Vorbefunden ein hemmender Effekt durch Astrozyten feststellen (Mai, 2006). Mit der Fragestellung, ob dies auch für weitere avirulente Stämme zutrifft, wurden Infektionsansätze mit NTE und 76K Toxoplasmen durchgeführt. Im Gegensatz zu den oben gezeigten Ergebnissen der beiden virulenten Stämme findet sich in Abb. 7 eine deutliche Proliferations-Hemmung bei allen gewählten INF- γ Konzentrationen. Dieses trifft für beide Infektionsdosen zu, wobei die etwas stärkere Ausprägung für den Ansatz mit 0,3 Toxoplasmen pro Zelle, erkennbar ist. Eine Steigerung der INF- γ Konzentration korreliert dabei gut mit einer zunehmenden Hemmung der Parasiten-Proliferation. Bei NTE Toxoplasmen kann so mit der höchsten INF- γ Konzentration eine bis zu 70%ige, bei 76K und ME49 sogar eine 90%ige Hemmung des Wachstums erreicht werden. Die für ME49 bereits beschriebene Hemmung avirulenter Toxoplasmen bestätigt sich somit für zwei weitere Stämme.

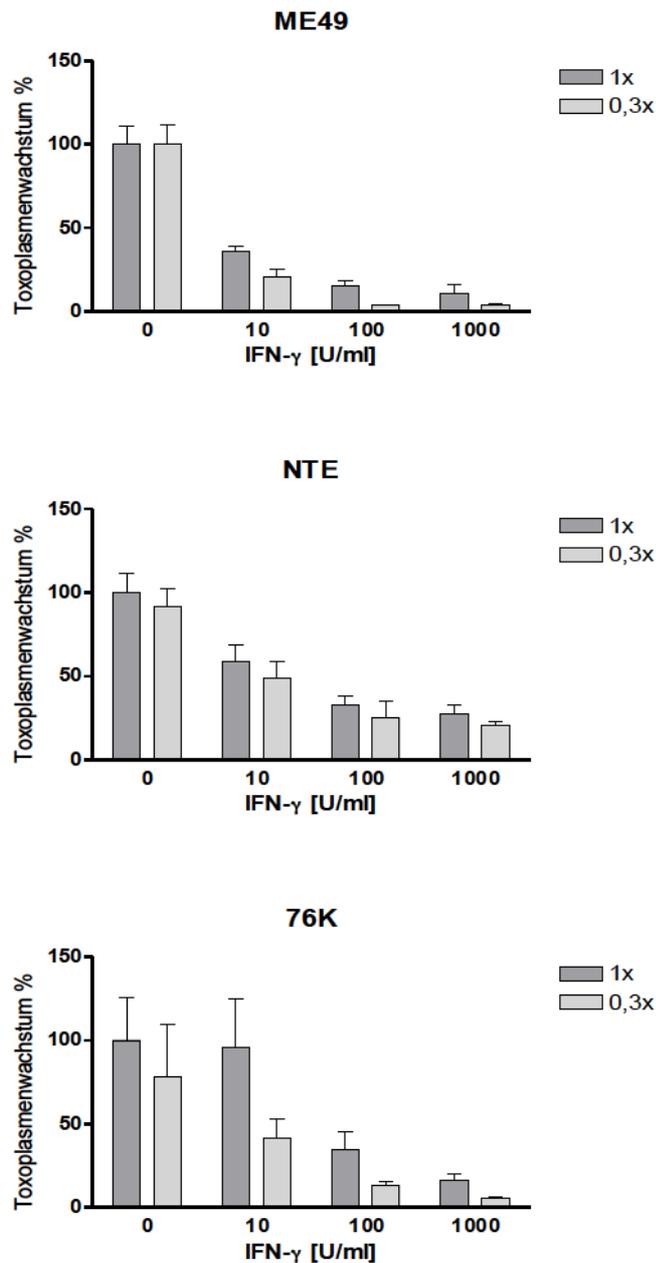


Abb. 7: IFN- γ abhängige Hemmung avirulenter *T. gondii* durch murine Astrozyten

Murine Astrozyten wurden mit 10, 100 oder 1000 U/ml IFN- γ vorstimuliert oder blieben unstimuliert. Nach Ablauf von 24 h erfolgte die Infektion mit ME49, NTE und 76K Toxoplasmen sowohl in einem Toxoplasmen-Astrozyten-Verhältnis von 1:1 als auch von 0,3:1. Die Toxoplasmen-Proliferation wurde anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem ^3H U gemessen. In unstimulierten Astrozyten kann die Toxoplasmen-Proliferation ungehindert ablaufen, dieser Wert entspricht deshalb 100% Toxoplasmen-Wachstum.

2 Herstellung ROP18 transfizierter *Toxoplasma gondii*

ROP18 gehört zur Familie der Rhoptrien-Kinasen, das eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des intrazellulären Toxoplasmen-Wachstums einnimmt (El Hajj et al., 2007a). Während der Parasit in die Wirtszelle eindringt, wird ROP18 zusammen mit anderen Proteinen aus den Rhoptrien freigesetzt. ROP18 lokalisiert dabei an der PV, wahrscheinlich auf der Seite zum Wirtszellzytosol hin.

Eine Fragestellung dieser Arbeit war es zu prüfen, ob die Expression des virulenten ROP18-Proteins in avirulenten Toxoplasmen einen Einfluss auf die p47 GTPasen-Rekrutierung hat. Um dies näher zu untersuchen, wurde die ROP18 kodierende Sequenz aus virulenten BK Toxoplasmen isoliert und in avirulente ME49 Toxoplasmen transfiziert.

2.1 Isolierung der ROP18 Sequenz aus virulenten BK Toxoplasmen

Nach Präparation der genomischen DNA aus NTE, ME49 und BK wurde diese aufgereinigt. Durch Verwendung spezifischer HH32iv Primer (siehe Material II 5.2) wurde das ROP18 Gen mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde unter Verwendung der Agaraosegel-Elektrophorese von unspezifischen Banden getrennt, das spezifische ROP18 PCR-Produkt von 1,7 kb Größe aus dem Gel ausgestochen, und im Anschluss eluiert und aufgereinigt.

2.2 Amplifikation / Klonierung in pCRII TOPO Vektor

Das zuvor aufgereinigte PCR-Produkt wurde mittels des „TOPO TA cloning Kits“ (Invitrogen) in den pCRII-TOPO Vektor ligiert und in kompetente *E.coli* Bakterien (DH5 α) transformiert. Die Bakterien nehmen dabei das Plasmid auf und ermöglichen dadurch die Vektor-Vermehrung. Aus jeweils 8 ROP18^{BK}, ROP18^{NTE} und ROP18^{ME49} gepickten *E.coli* Bakterienkolonien wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt und diese für eine Kontrollrestriktion mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verwendet. Dabei sollte anhand der entstehenden Fragmente geprüft werden, ob das ROP18 Gen im pCRII Vektor inseriert wurde.

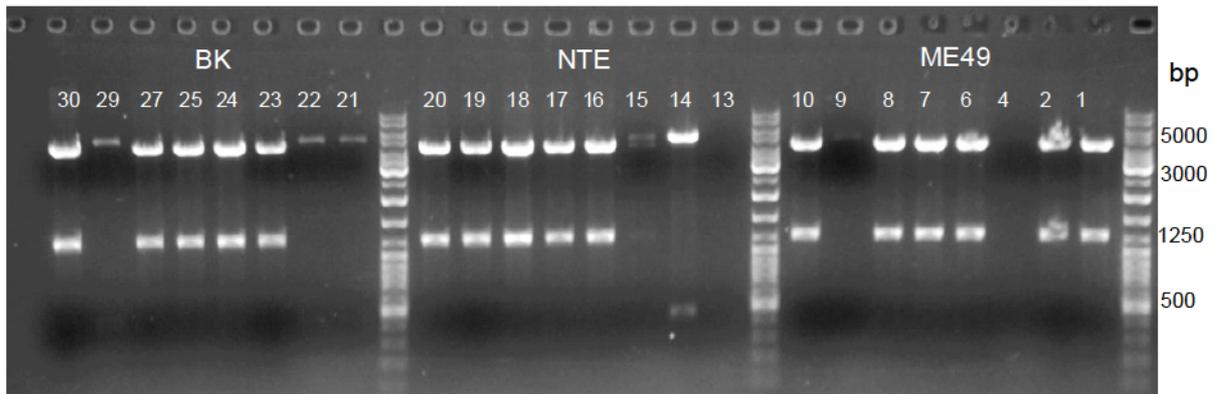


Abb. 8: Restriktionsverdau von pCRII+ROP18

Das aufgereinigte ROP18 PCR-Fragment wurde in den pCRII-TOPO Vektor ligiert und anschließend in dem Stamm *E. coli* DH5 α vermehrt. Aus den Bakterienkolonien gewonnene Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* geschnitten, im ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. 1-30 = *E. coli* -Klone

Der Restriktionsverdau wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die Größen der Banden mittels Marker bestimmt (Abb. 8). *EcoRV* schneidet einmal im Vektor pCRII und einmal im ROP18 Gen. Je nach Orientierung des ROP18 Inserts entstehen so zwei DNA Fragmente, die bei 5200bp und 450bp („sense“-Orientierung) oder 4400bp und 1250bp („antisense“-Orientierung) im Gel detektierbar sind. Für die weitere Klonierung spielt die Orientierung des ROP18 Inserts jedoch keine Rolle. Religierter pCRII Vektor hat eine Größe von 4 kb. Nur die DNA Fragmente von Klon Nr. 14 entsprachen der „sense“-Orientierung, Klone Nr. 4, 9, 13, 15, 21, 22 und 29 enthielten kein ROP18 Insert. Alle anderen Fragmente entsprachen dem Schnittmuster der „antisense“ Orientierung.

Das ROP18 Insert der Plasmide der Klone 1 (ME49), 16 (NTE) und 23 (BK) wurde durch Sequenzierung (GATC, Konstanz) validiert. Diese Plasmide wurden als Template für eine weitere PCR eingesetzt. Im Vergleich zu der ROP18 PCR des vorigen Schrittes wurden Primer verwendet, die zusätzlich zur ROP18 spezifischen Sequenz, neu Schnittstellen in das PCR Produkt einbringen. Diese ermöglichen das gerichtete Klonieren in den Ziel-Vektor pTub+c-myc. Das PCR-Produkt wurde im Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 9). Die drei Fragmente aus den unterschiedlichen Toxoplasmen-Stämmen zeigen die erwartete Größe von 1,7kb. Die Banden wurden ausgestochen und aufgereinigt.

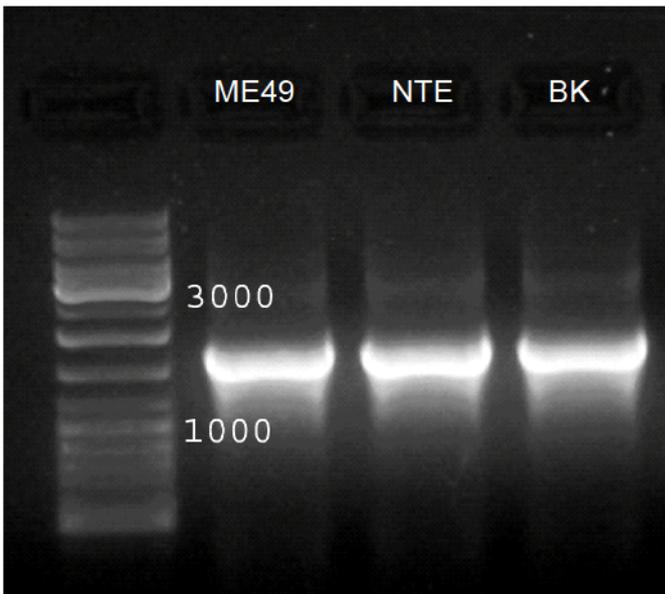


Abb. 9: PCR mit ROP18 spezifischen Primern

Der mit der ROP18 Sequenz legierte pCRII TOPO Vektor wurde in *E.coli* DH5 α Bakterienkolonien vermehrt und anschließend sequenziert. Aus je einer dieser Proben für ME49, NTE und BK wurde hier, mittels ROP18 spezifischer Primer, DNA-Fragmente mit überhängenden Restriktionsschnittstellen amplifiziert. Diese wurde auf einem ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.3 Klonierung in pTub+c-myc Vektor

Da bisher kein anti-ROP18-Ak kommerziell erhältlich ist, wurde der Vektor so gewählt, dass an das Protein (ROP18^{BK}) c terminal ein myc „Tag“ angehängt wurde, der die Detektion und somit die Bestimmung der Lokalisation von ROP18 über einen myc-spezifischen Antikörper ermöglicht.

Die aufgereinigte ROP18^{BK} DNA und der pTub+c-myc Expressions-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Avr*II geschnitten und so für die gerichtete Ligation vorbereitet. Anschließend erfolgte die Ligation des ROP18^{BK} Gens in den Vektor pTub+c-myc mit Hilfe der T4 Ligase. Das Ligationsprodukt wurde mittels Hitze-Schock in kompetente *E.coli* DH5 α Bakterien transformiert. Aus den ausplattierten Bakterienkolonien wurde anschließend Plasmid-DNA gewonnen, in der das ROP18^{BK} Insert mit Hilfe eines Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II nachgewiesen werden konnte (Abb. 10). So wurde anhand der Anzahl von Fragmenten der Klonierungserfolg nachvollzogen.

In Abb. 10 ist zu erkennen, dass alle Klone bis auf Nr. 3 den Vektor mit dem Insert ROP18^{BK} besitzen. Durch das Restriktionsenzym *Bgl*II wurde der Vektor in drei Fragmente der Größen

6525 bp, 1688 bp und 1267 bp geschnitten. Für den Vektor ohne Insert ergeben sich Fragmente mit den Größen 6554 bp und 1267 bp.

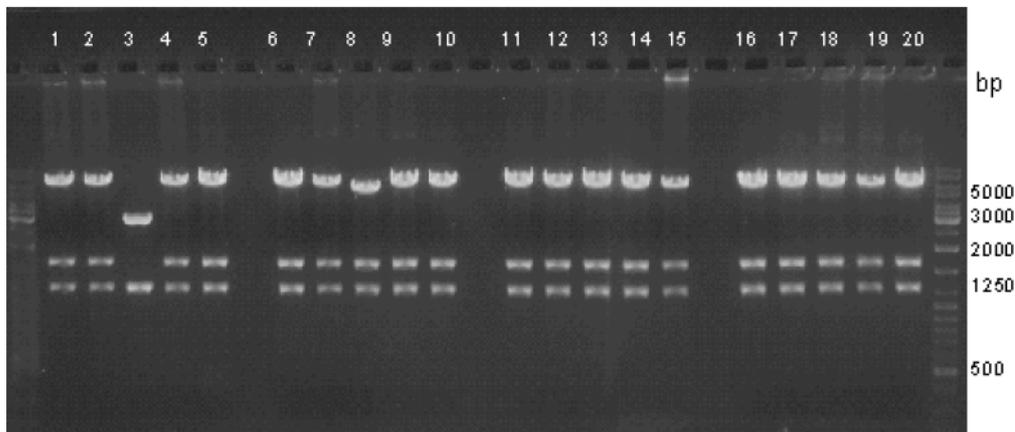


Abb. 10: Restriktionsverdau des Expressionsvektors pTub+c-myc mit ROP18^{BK} Insert

Die ROP18^{BK} DNA aus dem Gel in Abb. 9 wurde ausgestochen, aufgereinigt und anschließend mit dem Expressionsvektors pTub+c-myc ligiert. Nach Transformation in *E.coli* DH5α Bakterienkolonien wurden aus 20 Klonen pDNA präpariert und mit dem Restriktionsenzym *Bgl*I geschnitten
1-20 = *E.coli* -Klone

Aus den Klonen Nr. 6, 10 und 16 wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenz des ROP18^{BK} Gens aus BK Toxoplasmen vom Klon Nr. 16 war fehlerfrei und wurde für die Transfektion avirulenter Toxoplasmen eingesetzt.

2.4 Transfektion von ME49 Toxoplasmen mit pTub+ROP18^{BK}+c-myc

Um die avirulenten ME49 Toxoplasmen mit dem der ROP18 DNA aus virulenten BK Toxoplasmen zu transfizieren, wurden ME49 Toxoplasmen geerntet, in Cytomix resuspendiert und der Vektor pTub+ROP18^{BK}+c-myc hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Elektroporation wie in Abschnitt III 4.11.1 beschrieben.

Zur Kontrolle des Transfektionserfolges wurden alle fünf Passagen Proben der mit ROP18^{BK} transfizierten avirulenten ME49, im Folgenden als ME49 (ROP18^{BK}) bezeichnet, mit einem anti-c-myc-Ak immungefärbt. Wie in Abb. 11 gezeigt, sind in der ersten, im Gegensatz zu späteren Passagen, nur vereinzelt positiv transfizierte ME49 Toxoplasmen [ME49 (ROP18^{BK})], hier grün angefärbt, zu erkennen. Diese Selektion der ME49 (ROP18^{BK})

Toxoplasmen wurde durch dauerhafte Kultivierung mit chloramphenicolhaltigem Medium erreicht.

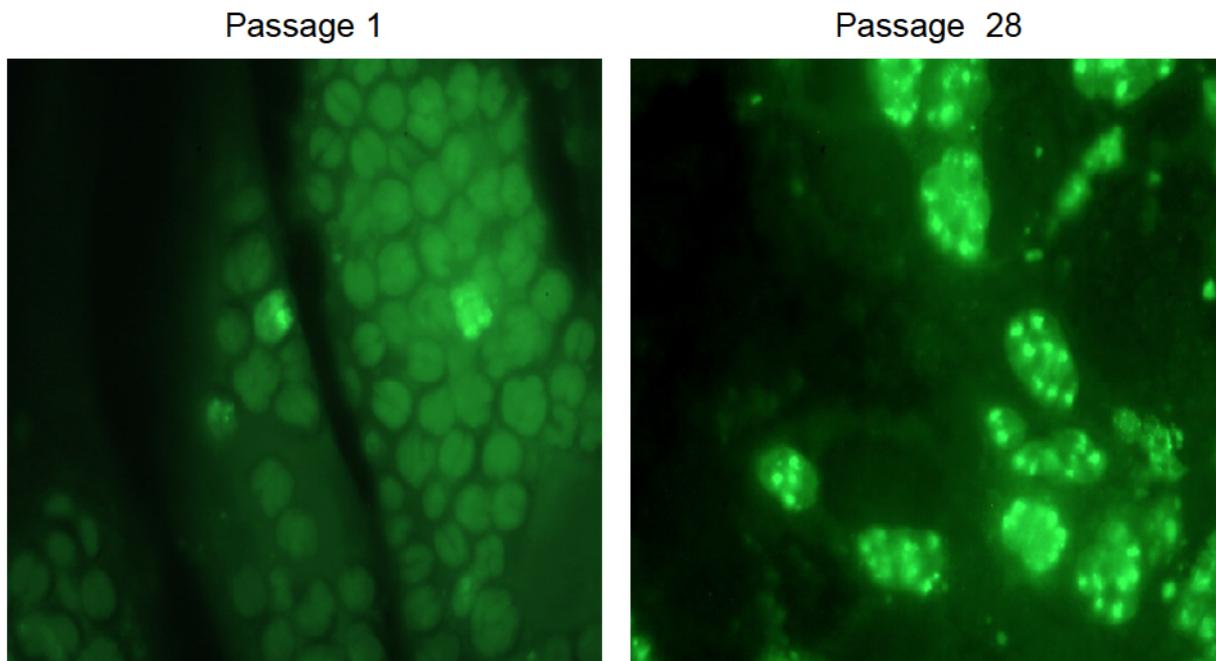


Abb. 11: Nachweis von c-myc in transfizierten ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen

Nach Transfektion via Elektroporation von avirulente ME49 Toxoplasmen mit pTub+ ROP18^{BK}+c-myc Vektor wurde der Transfektionserfolg durch Immunfärbung mit einem anti-c-myc-Ak und entsprechend fluoreszenzgekoppelten Sekundär-Ak nachgewiesen. Positiv transfizierte ME49 Toxoplasmen [ME49 (ROP18^{BK})] leuchten grün.

2.5 Monoklonierung der ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen

Nach Erlangen einer stabil transfizierten Population von Toxoplasmen wurden diese monokloniert. Hierzu wurden die ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen in einer 96 Well-Platte bis auf eine theoretische Anzahl von 0,1 Toxoplasmen pro Well verdünnt und ausgesät. So konnte sichergestellt werden, dass sich in jedem Well maximal ein Parasit vermehren konnte. Die monoklonierten ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen-Kolonien wurden als 6.5.1, 6.5.2 und 6.5.3 bezeichnet.

2.5.1 Nachweis der c-myc Expression in monoklonalen ME49 (ROP18^{BK})

Toxoplasmen

Anschließend wurden die monoklonalen ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen mit einem anti-c-myc-Ak immungefärbt. Zusätzlich zu der Fragestellung, ob die Toxoplasmen positiv transfiziert sind, wurde hier ferner ein besonderes Augenmerk auf die Lokalisation des c-myc markierten ROP18 gelegt. Wie oben bereits erwähnt, ist ROP18 ein Protein, welches in den Rhoptrien des Parasiten lokalisiert ist. *T. gondii* besitzt apikal gelegen 8-12 dieser keulenförmigen Zellorganellen (Boothroyd und Dubremetz, 2008). In Abb. 12 wurden ME49 (ROP18^{BK}) im linken Bild mit einem anti-ROP 2,3,4 -Ak angefärbt, der die Lokalisation der Rhoptrien aufzeigt. Auf dem rechten Bild wurden ME49 (ROP18^{BK}) mit einem anti-c-myc-Ak visualisiert, der das transfizierte ROP18^{BK}-Protein markiert. Man erkennt deutlich in beiden Bildern mehrere gleichförmige Strukturen mit vergleichbarer Lokalisation. Dies lässt darauf schließen, dass das klonierte ROP18^{BK}-Protein auch wie erwartet in den Rhoptrien der ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen lokalisiert.

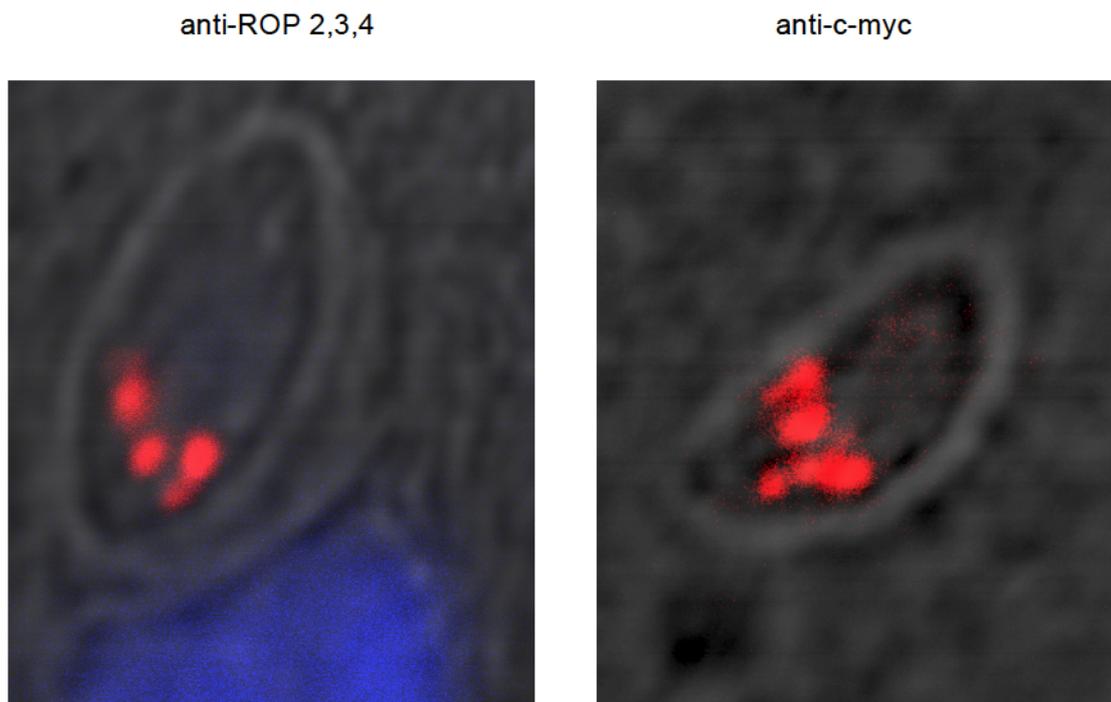


Abb. 12: Lokalisation von Rhoptrien und Nachweis von ROP18^{BK}c-myc Expression in ME49 (ROP18^{BK})

ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen wurden mit den angegebenen Ak gefärbt und im Konfokalmikroskop aufgenommen.

Zur Überprüfung der Expressionsintensität von ROP18^{BK} in den transfizierten Toxoplasmen wurden Proteinlysate erstellt und das Protein mittels Western Blot mit einem anti-c-myc-Ak detektiert.

Wie in Abb.13 gezeigt, findet sich bei allen drei monoklonalen ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen (6.5.1, 6.5.2 und 6.5.3) ein Signal in der Höhe von 55 kDa. Diese Bande entspricht der zu erwartenden Größe des ROP18-Proteins von 55 kDa. Als Positivkontrolle diente das Toxoplasmen Protein GRA7, welches in allen Toxoplasmen zu finden ist.

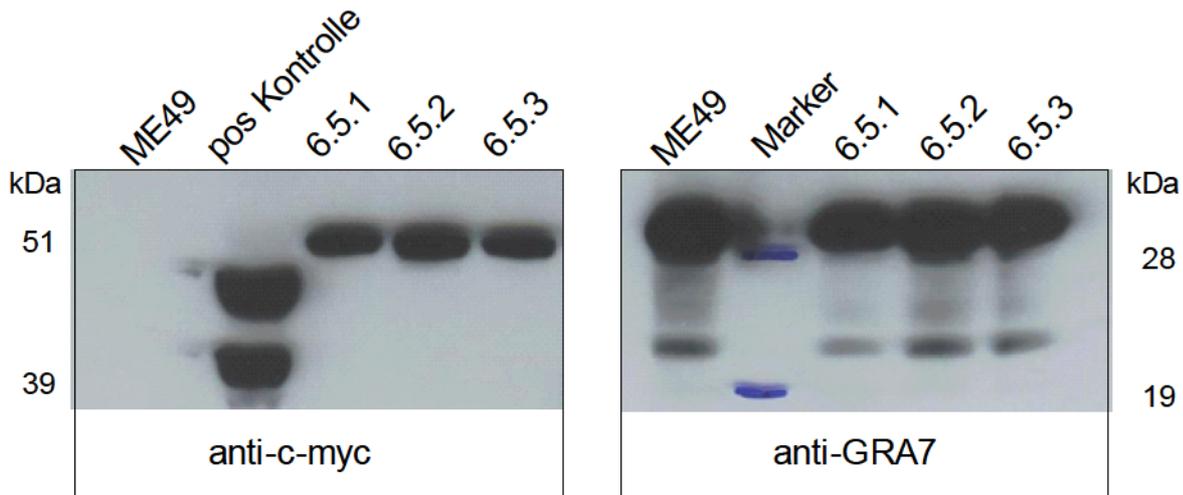


Abb. 13: Nachweis von ROP18^{BK} Expression im Western Blot

Aus ME49 Wildtyp und ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen (6.5.1, 6.5.2 und 6.5.3) wurde Toxoplasmenlysat angefertigt. Anschließend wurde das ROP18-Protein mit einem anti-c-myc-Ak (linkes Bild), und als positive Kontrolle mit anti-GRA7-Ak (rechtes Bild) ein in Toxoplasmen ubiquitäres Dense Granula Protein nachgewiesen (pos Kontrolle: HELA transfiziert mit p40/p49-c-myc).

ROP18 = 55kDa

GRA7 = 30 kDa

Alle ME49 ROP18^{BK} Transfektanten zeigen ein deutliches Signal an der zu erwartenden Position. Dies lässt auf eine Expression von ROP18-Protein in den Transfektanten schließen.

3 p47 GTPasen Expression in *Toxoplasma gondii* infizierten Astrozyten

Einen bekannten antimikrobiellen Effektormechanismus in Mäusen stellen die p47 GTPasen dar. Es konnte gezeigt werden, dass in Toxoplasmen infizierten Astrozyten, diese GTPasen um die PV akkumulieren und zu deren Zerstörung beitragen (Martens et al., 2005; Melzer et al., 2008). Diese Zerstörung wurde, wie auch im Folgenden, an Hand eines Dense Granula Protein (GRA7) nachgewiesen. Das *T. gondii* Protein GRA7 wird frühzeitig nach dem Eindringen in die Wirtszelle vom Parasiten sekretiert und assoziiert mit dem tubulovesikulären Netzwerk der PV sowie der PVM. Nach Schädigung der PVM gelangt GRA7 ins Zytoplasma der Zelle. Vorausgehende Ergebnisse konnten zeigen, dass sich die GTPasen-Rekrutierung zwischen virulenten und avirulenten Toxoplasmen unterscheidet (Mai, 2006). Virulente BK Toxoplasmen zeigen eine geringere IIGP Rekrutierung, des Weiteren sind murine Astrozyten nicht in der Lage das Wachstum virulenter Toxoplasmen IFN- γ abhängig zu hemmen. Ein Zusammenhang zwischen GTPasen-Rekrutierung und Hemmung des Toxoplasmen-Wachstums wäre naheliegend, wurde allerdings bisher nicht beschrieben.

In dieser Arbeit sollte die Akkumulation der p47 GTPasen (IIGP und TGTP) an die PV näher untersucht werden. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf dem zeitlichen Verlauf der GTPasen-Rekrutierung an virulenten, avirulenten und ME49 (ROP18^{BK})Toxoplasmen sowie auf der gegenseitigen Beeinflussung der GTPasen. Des Weiteren sollte die Anzahl der IIGP und TGTP positiven Vakuolen in eine Beziehung mit GRA7 positiven Vakuolen gebracht werden, um den vermuteten Zusammenhang zwischen GTPasen-Rekrutierung und Zerstörung der Parasiten zu erhärten.

Hierfür wurden Astrozyten auf Deckgläschen ausgesät und anschließend mit einer definierten Menge von Toxoplasmen infiziert. Immunfärbungen mit anti-GRA7-Ak und anti-IIGP-Ak bzw. anti-TGTP-Ak folgten. Die Wirtszell- und Toxoplasmen-Kerne wurden mit DAPI visualisiert.

3.1 Kinetik der IIGP Rekrutierung an die PV virulenter und avirulenter Toxoplasmen

Die IIGP Rekrutierung avirulenter Toxoplasmen wurde für die Stämme ME49 und NTE untersucht. Wie in Abb. 16 gezeigt, konnte eine IIGP Akkumulation an der PV in einem Zeitraum von 30 min bis 8 h nachgewiesen werden, wohingegen frühere bzw. spätere Zeitpunkte nur ganz vereinzelt positive PV erkennen ließen.

Die stärkste IIGP Rekrutierung konnte zwischen 1 h und 2 h mit ca. 15-25% positiven Vakuolen detektiert werden, mit einem erkennbaren Maximum bei 2 h. Anschließend sank die Anzahl auf ca. 10% ab.

Ein deutlich anderes Ergebnis zeigten virulente BK und RH-YFP Toxoplasmen hinsichtlich der IIGP Rekrutierung an die PV. Die Akkumulation ist über den gesamten Zeitraum stark reduziert. Eine Ausnahme bildet hierbei der 15 min Wert bei RH-YFP Toxoplasmen mit einer bis zu 10%igen IIGP Rekrutierung. Zu allen anderen Zeitpunkten liegt das Maximum positiver Vakuolen bei 5% oder weniger.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IIGP Rekrutierung an der PV virulenter gegenüber avirulenter Toxoplasmen deutlich reduziert ist.

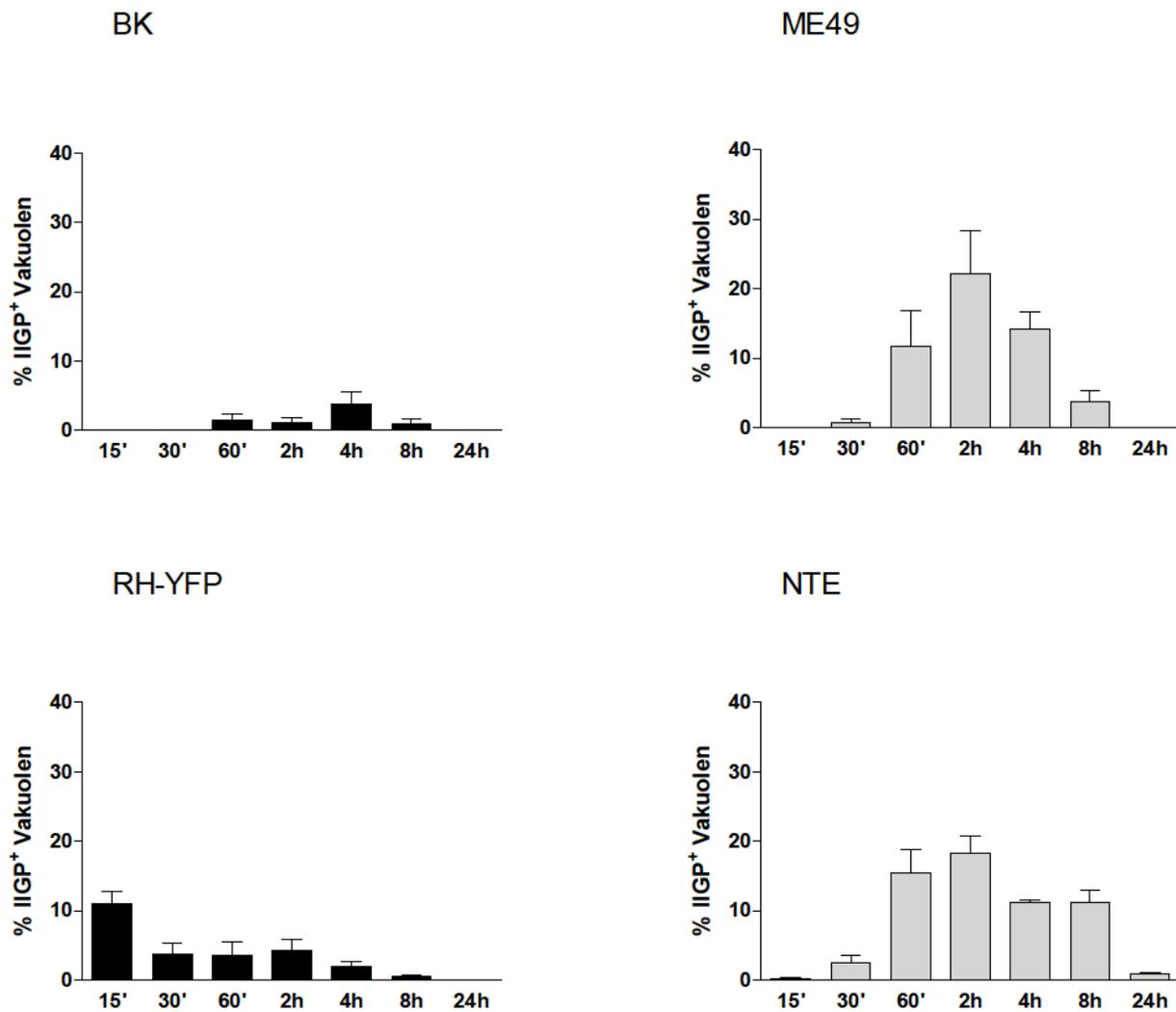


Abb. 14: Kinetik der IIGP Rekrutierung an die PV virulenter und avirulenter *T. gondii*

6×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion mit 1×10^7 Toxoplasmen wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (zwischen 15 min und 24 h) erfolgte die Fixierung mit 3% Paraformaldehyd. Immunfärbung erfolgte mit anti-IIGP-Ak und DAPI Kernfärbung.

Betrachtet man zu einem gegebenen Zeitpunkt virulente und avirulente IIGP positive PV, so lassen sich diese fluoreszenzmikroskopisch nicht voneinander unterscheiden. Im zeitlichen Verlauf kann hingegen eine Veränderung der positiven Vakuolen beobachtet werden, wobei sich vor allem zu frühen Zeitpunkten sowie in der Zeit der maximalen Rekrutierung eine vollständige Umrandung der PV mit IIGP erkennen lässt. Zwischen 4 h und 8 h zeigt sich hingegen nur eine punktuell konzentrierte Akkumulation von IIGP an der PV (Abb. 15).

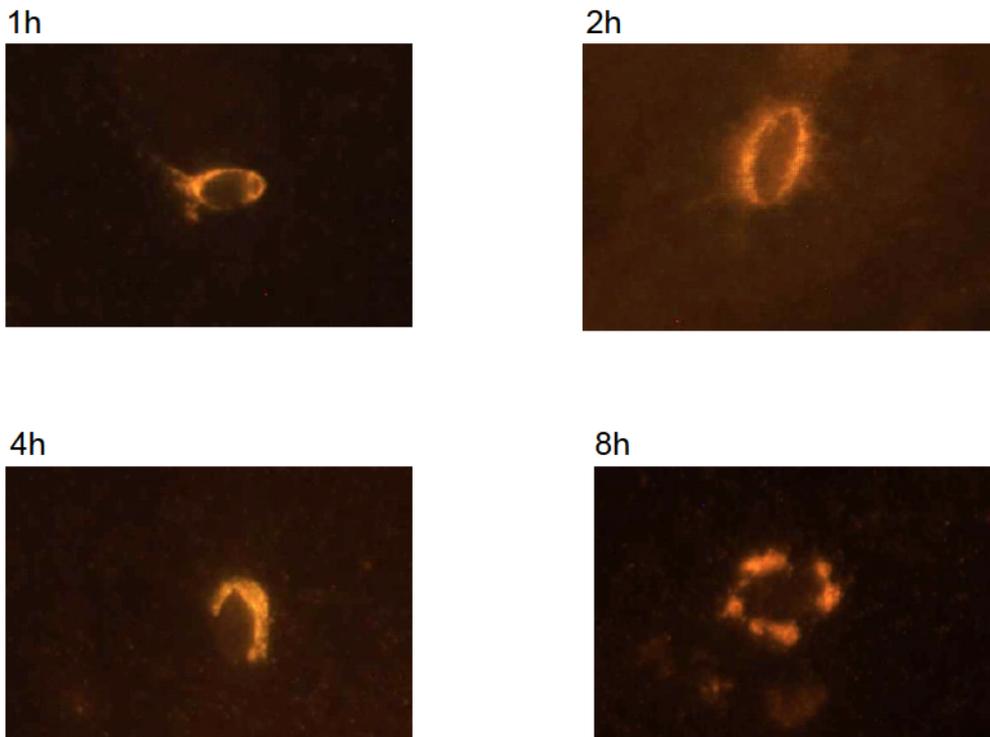


Abb. 15: Morphologie der IIGP⁺ Vakuolen zu verschiedenen Zeitpunkten

6×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion mit 1×10^7 Toxoplasmen wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut inkubiert. Nach jeweils 1 h, 2 h, 4 h und 8 h erfolgte die Fixierung mit 3% Paraformaldehyd. Immunfärbung erfolgte mit anti-IIGP-Ak.

Dieser in Abb. 15 gezeigte Prozess wird in der Literatur als Reifung der PV beschrieben und in Zusammenhang mit deren Zerstörung gebracht. Es werden hierbei drei Stadien der PV beschrieben, glatt, rau und rupturiert (Martens et al., 2005). Zum 1 h Zeitpunkt erkennt man das als glatt bezeichnete Stadium der PV, zum 2 h und 4 h das raue Stadium und zum 8 h das rupturierte Stadium der PV (Abb. 15).

3.2 IIGP Rekrutierung an die PV in einer Mischinfektion mit avirulenten und virulenten Toxoplasmen

Virulente Toxoplasmen zeigen eine verminderte GTPasen-Rekrutierung an die PV, wie in Abschnitt IV 3.1 gezeigt wurde. Es gilt nun zu klären, ob virulente Toxoplasmen die

vermindert GTPasen-Rekrutierung an die PV erreichen, indem sie die Wirtszelle modulieren, oder ob dies eine spezielle Eigenschaft der virulenten PV ist. Daher sollte untersucht werden, ob die GTPasen-Rekrutierung avirulenter Toxoplasmen von virulenten Toxoplasmen beeinflusst wird, wenn beide Toxoplasmen-Stämme zusammen eine einzelne Zelle infizieren. Die hierfür notwendige Unterscheidung der virulenten RH von den avirulenten ME49 Toxoplasmen wurden durch YFP exprimierende virulente RH Toxoplasmen (RH-YFP) erzielt.

Da in dieser Arbeit zum ersten Mal ein gemischter Infektionsansatz mit virulenten und avirulenten Toxoplasmen benutzt wurde, sollten zunächst die Infektionsraten der einzelnen Toxoplasmen-Stämme untersucht werden. Hierfür wurden Einzelinfektionen mit ME49 (avirulent) und RH-YFP (virulent) Toxoplasmen angesetzt und im Ergebnis mit einem gemischten Infektionsansatz ME49 + RH-YFP verglichen. Die Infektionsdosis betrug für jede Einzelinfektion 3×10^6 sowie 6×10^6 . Für den gemischten Infektionsansatz wurden 3×10^6 RH-YFP und 3×10^6 ME49 Toxoplasmen eingesetzt (Infektionsverhältnis von 1:1).

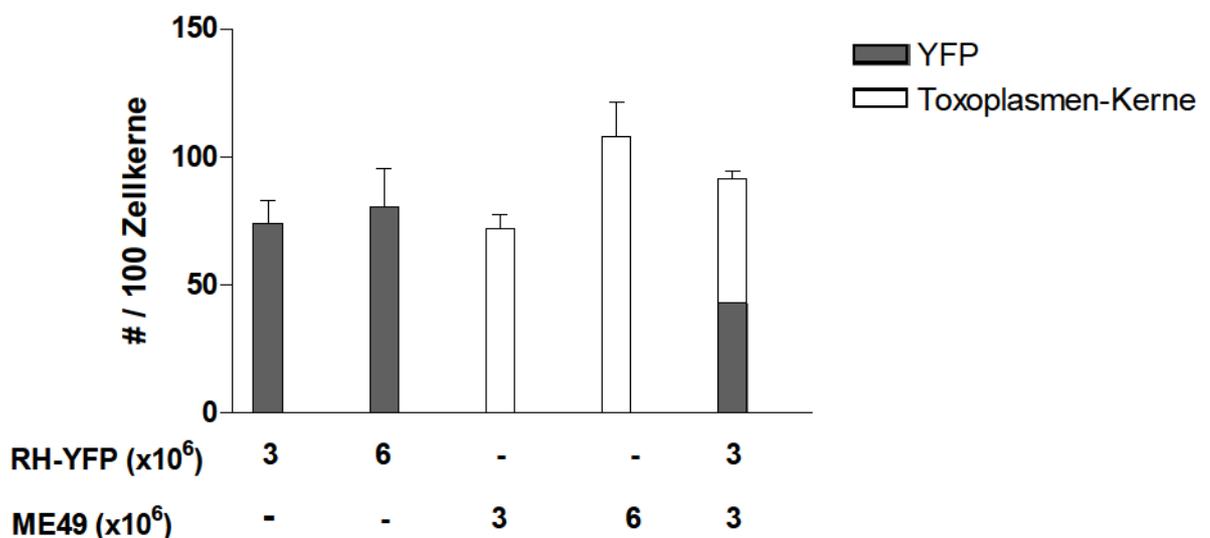


Abb. 16: Infektionsraten von ME49, RH-YFP und ME49+RH-YFP Toxoplasmen

6×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion mit den angegebenen Infektionsdosen wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut für 2 h inkubiert. Nach Fixierung mit 3% Paraformaldehyd wurden die Wirtszell- und Toxoplasmen-Kerne mit DAPI visualisiert.

Wie in Abb. 16 gezeigt sind die Infektionsraten für 3×10^6 Toxoplasmen in den Einzel-Ansätzen vergleichbar konstant und lassen für eine Verdopplung der eingesetzten Toxoplasmendosis nur einen leichten Anstieg der Infektionsrate erkennen, was auf einen

Sättigungseffekt schließen lässt. Die Infektionsrate in der Mischinfektion von 3×10^6 RH-YFP und 3×10^6 ME49 Toxoplasmen ist vergleichbar mit den Einzelinfektionen.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass virulente ME49 wie auch avirulente RH-YFP Toxoplasmen in gleichen Verhältnissen die Wirtszelle infizieren.

Um eine Aussage über eine mögliche Beeinflussung der GTPasen-Rekrutierung avirulenter ME49 Toxoplasmen durch virulente RH-YFP Toxoplasmen-Stämme treffen zu können, mussten einzelne Zellen betrachtet werden, die mindestens mit einem virulenten und einem avirulenten Toxoplasmen infiziert waren. Dazu wurde ein nicht dichtgewachsener Astrozytenmonolayer benutzt, in dem sich lichtmikroskopisch einzelne Zellen klar voneinander abgrenzen ließen.

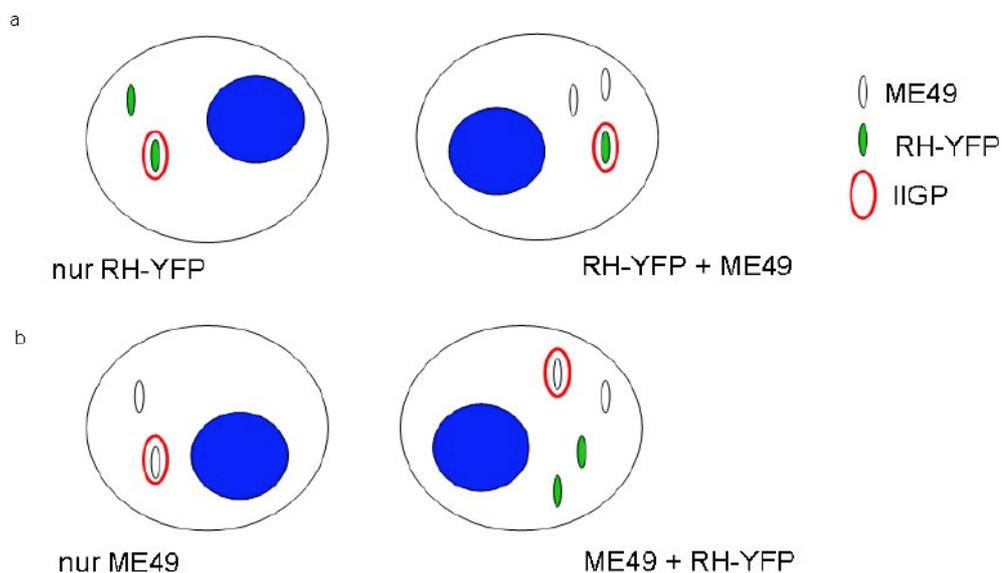


Abb. 17: Versuchsaufbau zur Fragestellung, ob in einer Wirtszelle virulente Parasiten die PV avirulenter Parasiten beeinflussen

Verglichen wurde, wie in Abb. 17a gezeigt, die IIGP Rekrutierung an RH-YFP Toxoplasmen in einer Einzelinfektion und auch in der Mischinfektion RH-YFP+ME49. Entsprechend erfolgte die Auszählung der IIGP Rekrutierung an ME49 Toxoplasmen ebenfalls in der Einzelinfektion sowie in der Mischinfektion ME49+RH-YFP (Abb. 17b).

Die Dauer der Infektion betrug 2 h, da zu diesem Zeitpunkt die stärkste IIGP Rekrutierung an die PV avirulenter ME49 Toxoplasmen stattfand (Abb. 14).

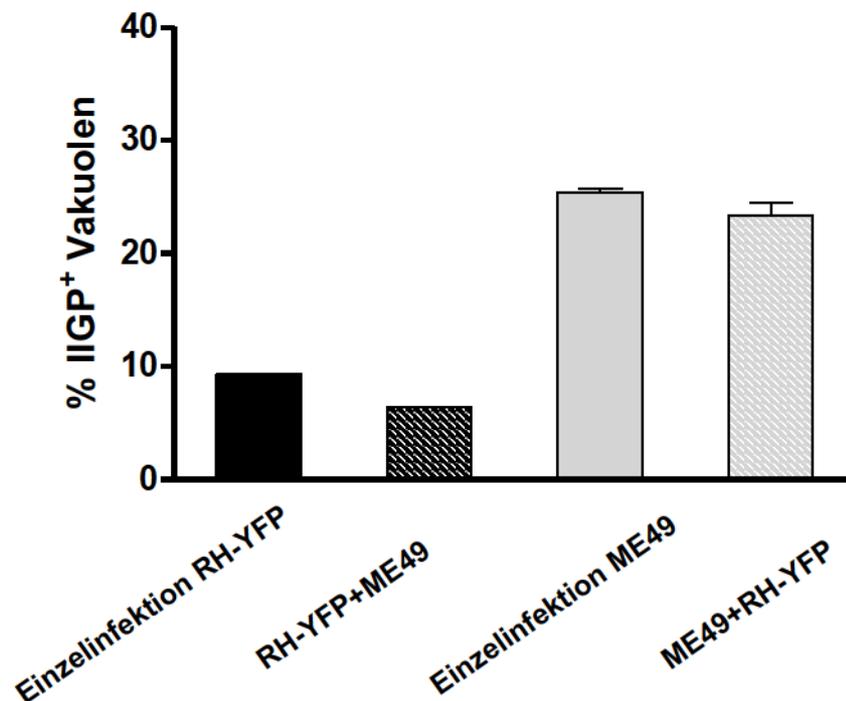


Abb. 18: IIGP Rekrutierung an die PV in Einzel- und Mischinfektion

4×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert und noch vor Erreichen eines konfluenten Monolayers 15 min pulsinfiziert. Anschließend wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut für 2 h inkubiert. Nach Fixierung mit 3% Paraformaldehyd wurden die Wirtszell- und Toxoplasmen-Kerne mit DAPI visualisiert. Die Immunfärbung erfolgte mit anti-IIGP-Ak.

Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, wird die IIGP Rekrutierung an die PV von ME49 nicht durch die gleichzeitige Anwesenheit von virulenten RH-YFP Toxoplasmen vermindert. Die Anzahl der IIGP positiven Vakuolen in einer mehrfach nur mit ME49 Toxoplasmen infizierten Zelle liegt bei ca. 25%. Im Vergleich dazu zeigt eine Zelle, die sowohl mit RH-YFP als auch mit ME49 Toxoplasmen infiziert ist, keinen deutlichen Unterschied der IIGP Rekrutierung an die PV von ME49 Toxoplasmen. Dieser Versuch wurde ebenfalls für einen Infektionszeitraum von einer Stunde mit vergleichbarem Ergebnis (Daten nicht gezeigt) durchgeführt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verminderte GTPasen-Rekrutierung virulenter Toxoplasmen durch Eigenschaften der individuellen PV entstehen und nicht durch eine Modulation der Wirtszelle.

3.3 Kinetik der IIGP Rekrutierung an die PV bei ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen

Um die Frage zu beantworten, ob die Expression von ROP18 aus BK Toxoplasmen einen Einfluss auf die IIGP Rekrutierung in avirulenten ME49 hat, wurden zwei monoklonale ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen-Stämme benutzt, bezeichnet als 6.5.1 und 6.5.3. Bei beiden Stämmen lässt sich in Abb. 19 im Zeitraum von 1 h bis 8 h eine Rekrutierung von IIGP an die PV beobachten, wobei die maximale Akkumulation bei 2 h liegt. Für den Klon 6.5.1 beläuft sich das Maximum positiver Vakuolen auf 10%, wengleich der 1 h bzw. der 4 h Wert mit nur ca. 5%, und der 8 h Wert mit nur ca. 2% deutlich niedriger liegen. Die Rekrutierung von IIGP an die PV für den Klon 6.5.3 beträgt nach einem Zeitraum von einer Stunde ebenfalls 5%, für die Zeitpunkte 4 h und 8 h hingegen etwas über 5%. Die maximale Rekrutierung findet sich auch bei diesem Klon bei 2 h und beträgt ca. 15%.

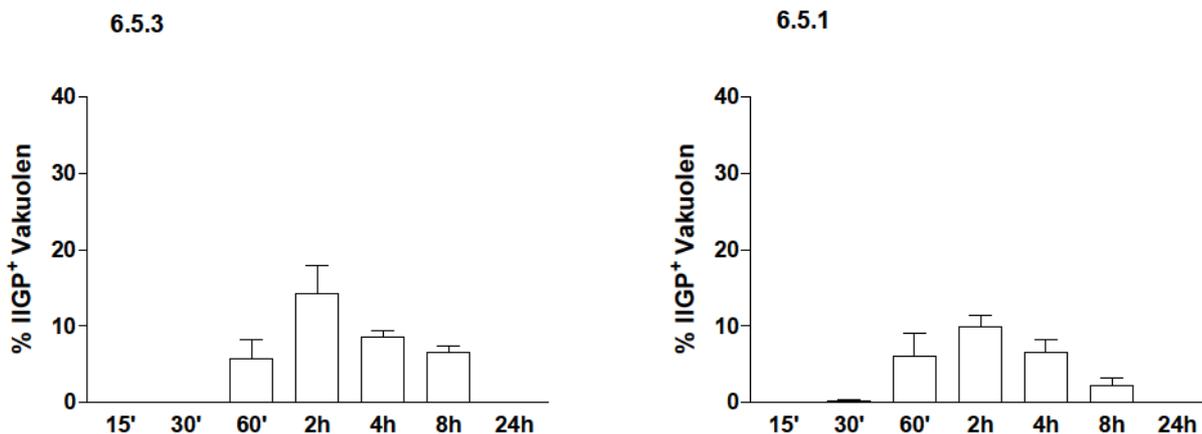


Abb. 19: Kinetik der IIGP Rekrutierung an die PV bei ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen

6x10⁵ Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion mit 1x10⁷ Toxoplasmen wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN-γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (zwischen 15 min und 24 h) erfolgte die Fixierung mit 3% Paraformaldehyd. Immunfärbung erfolgte mit anti-IIGP-Ak und DAPI Kernfärbung.

Im Vergleich mit Abb. 14 verhalten sich die ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen im Bezug auf die IIGP Rekrutierung im zeitlichen Verlauf wie avirulente ME49 Toxoplasmen. Des Weiteren liegt das Maximum der Rekrutierung sowohl für ME49 als auch für ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen bei zwei Stunden. Im Vergleich zu avirulenten ME49 Toxoplasmen, bei denen die maximale Rekrutierung bei 20% liegt, ist bei den ME49 (ROP18^{BK}) eine Reduktion auf 10-15% IIGP positive Vakuolen zu beobachten. Bei virulenten Toxoplasmen lässt sich zu diesem Zeitpunkt eine maximal Rekrutierung von 2-5% erkennen.

Die IIGP Rekrutierung von ME49 (ROP18^{BK}) ist vergleichbar mit der von avirulenten Toxoplasmen (Abb. 14), wenn gleich der Prozentsatz geringer ist.

3.4 Kinetik der TGTP Rekrutierung an die PV virulenter und avirulenter Toxoplasmen

In den folgenden Versuchen wurde eine zweite p47 GTPase, TGTP, näher untersucht. Hierbei wurden die Kinetiken für die TGTP Rekrutierung unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen durchgeführt, sowie die vorausgegangenen IIGP-Kinetiken. Als virulente Toxoplasmen wurden erneut BK und RH-YFP Toxoplasmen verwendet. Als avirulente Toxoplasmen wurden ME49 und NTE Toxoplasmen untersucht.

Bei der Analyse der BK Toxoplasmen zeigt sich nur eine sehr schwache TGTP Rekrutierung von dem ersten gemessenen Zeitpunkt an (15 min) bis hin zu 4 h (Abb. 20). Zu allen Zeitpunkten ist die TGTP Akkumulation auf einem konstanten Niveau und variiert lediglich um 1-2%.

Bei den virulenten RH-YFP Toxoplasmen hingegen ist ein deutliches Maximum der TGTP Rekrutierung an die PV mit ca. 15% positiven Vakuolen bei 4 h zu erkennen. Bei den Zeitpunkten 2 h und 8 h liegt die Rekrutierung bei ca. 5%, zu früheren Zeitpunkten hingegen, unter 1%. Nach 24 h konnten keine TGTP positiven Vakuolen mehr beobachtet werden.

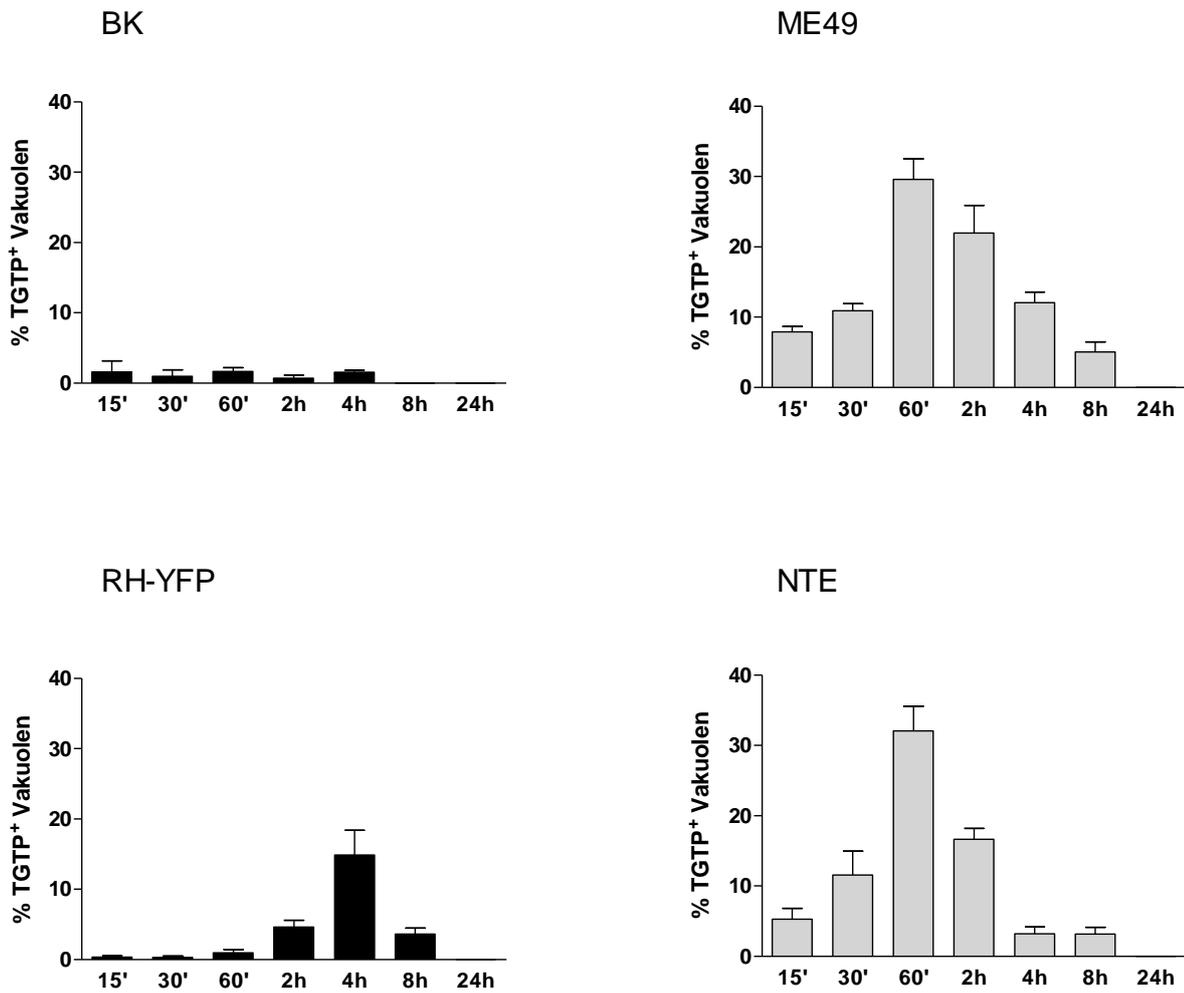


Abb. 20: Kinetik der TGTP Rekrutierung an die PV virulenter und avirulenter *T. gondii*

6×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion mit 1×10^7 Toxoplasmen wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (zwischen 15 min und 24 h) erfolgte die Fixierung mit 3% Paraformaldehyd. Immunfärbung erfolgte mit anti-TGTP-Ak und DAPI Kernfärbung.

Im Gegensatz zu den virulenten Stämmen findet sich sowohl für NTE als auch für ME49 Toxoplasmen eine verstärkte TGTP Rekrutierung zu allen beobachteten Zeitpunkten, mit Ausnahme des 24 h Wertes. Bereits zwischen 15 min und 30 min liegt die Rekrutierung bei 5-10%. Die stärkste Rekrutierung bei beiden avirulenten Stämmen liegt mit ca. 30% TGTP positiven Vakuolen bei einer Stunde, gefolgt von einem stufenförmigen Abfall bis auf 5% bei 8 h.

Während bei virulenten Toxoplasmen nur eine schwache TGTP Rekrutierung von maximal 15% zu beobachten ist, erkennt man bei avirulenten Toxoplasmen eine verstärkte Rekrutierung zu allen gegebenen Zeitpunkten. Somit zeigen beide hier untersuchten GTPasen IIGP und TGTP ähnliches Rekrutierungsverhalten in Bezug auf virulente und avirulente Toxoplasmen.

3.5 Kinetik der TGTP Rekrutierung an die PV bei ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen

Wie auch für IIGP, wurden für die Kinetiken der TGTP Rekrutierung die zwei monoklonale ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmenstämme 6.5.1 und 6.5.3 benutzt.

Der Klon 6.5.3 lässt zu allen untersuchten Zeitpunkten eine TGTP Rekrutierung an die PV erkennen (Abb. 21). Beginnend mit ca. 5% bei 15 min, steigt die Anzahl der positiven Vakuolen nach 30 min auf 10% und nach einer Stunde bereits auf 25%, um dann ein Maximum von 30% bei 2 h zu erreichen. Nach 4 h ist die TGTP Rekrutierung auf 15% und nach 8 h auf ca. 5 % zurückgegangen. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt nach 24 h, ist sie kaum noch nachzuweisen.

Bei dem zweiten untersuchten ME49 (ROP18^{BK}) Klon (6.5.1) ist die gesamte Rekrutierung von TGTP sehr viel schwächer ausgeprägt und ließ weder zum 15 min noch zum 24 h Zeitpunkt TGTP positive Vakuolen erkennen. Das Maximum lag mit etwas über 20% positiven Vakuolen bei 2 h. Zu allen anderen Zeitpunkten lag die Rekrutierung relativ konstant im Bereich von 8 %.

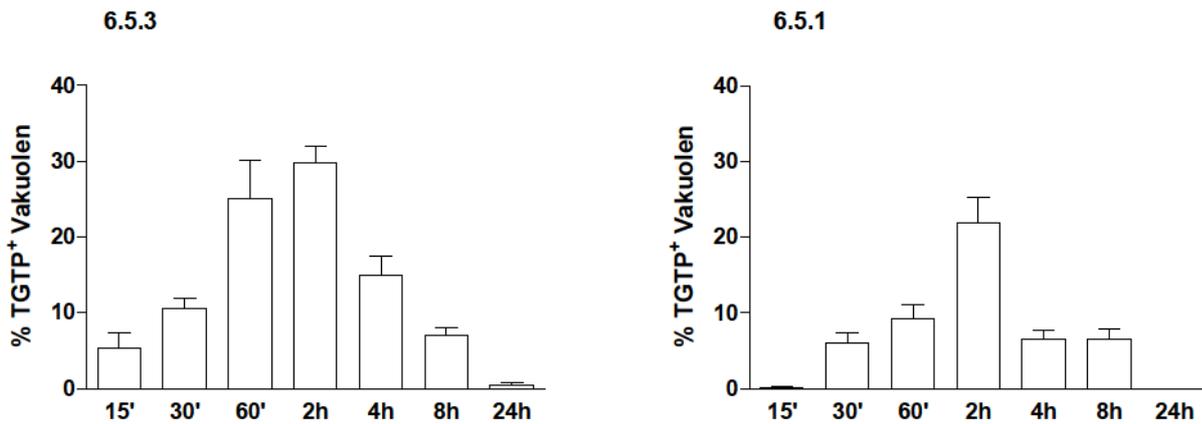


Abb. 21: Kinetik der TGTP Rekrutierung an die PV bei ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen

6×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion mit 1×10^7 Toxoplasmen wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (zwischen 15 min und 24 h) erfolgte die Fixierung mit 3% Paraformaldehyd. Immunfärbung erfolgte mit anti-TGTP-Ak und DAPI Kernfärbung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich beide ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmenklone zwar in den absoluten Werten der TGTP Rekrutierung unterscheiden, tendenziell jedoch in der Verteilung und der maximalen Rekrutierung vergleichbar sind. Im Vergleich mit Abb. 20 erkennt man eine größere Ähnlichkeit des TGTP Akkumulationsverhaltens von ME49 (ROP18^{BK}) mit avirulenten Toxoplasmen-Stämmen. Die Expression des virulenten ROP18 Allels in ME49 Toxoplasmen hat keinen quantitativen Einfluss auf die Rekrutierung von TGTP an der PV. Insofern konnte hier für zwei untersuchte monoklonale ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen-Stämme kein signifikanter Unterschied an Hand der Rekrutierung von sowohl IIGP als auch TGTP gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden.

3.6 Kinetik der TGTP und IIGP Rekrutierung an die parasitophore Vakuole avirulenter Toxoplasmen in einer Kofärbung

Um herauszufinden, ob IIGP und TGTP an der PV kolokalisieren oder räumlich getrennt auftreten, wurden drei Infektionszeitpunkte (1 h, 2 h und 4 h) gewählt, an denen eine hohe IIGP und TGTP Rekrutierung vorliegt (Abb. 26).

Für die Infektion wurden avirulente ME49 Toxoplasmen verwendet. Die Präparate wurden hier sowohl mit anti-IIGP-Ak als auch mit anti-TGTP-Ak immungefärbt.

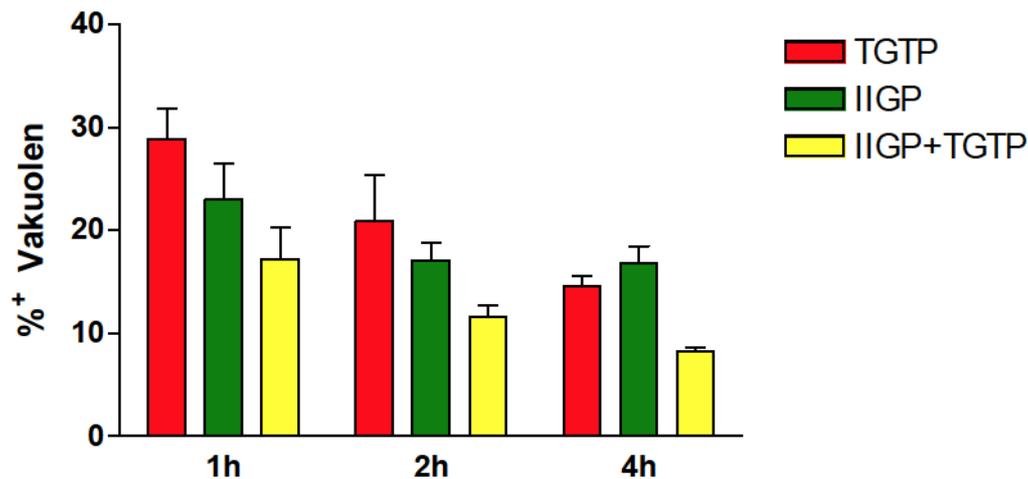


Abb. 22: Kinetik der TGTP und IIGP Rekrutierung an die PV von ME49 Toxoplasmen in einer Kofärbung

6×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion mit 1×10^7 Toxoplasmen wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut für 1 h, 2 h und 4 h inkubiert. Nach Fixierung mit 3% Paraformaldehyd wurden die Deckgläschen sowohl mit anti-TGTP-Ak als auch mit anti-IIGP-Ak immungefärbt.

Quantitativ konnte zu allen drei Zeitpunkten ein deutlicher Prozentsatz sowohl TGTP als auch IIGP positiver Vakuolen nachgewiesen werden (Abb. 22).

Nach einer Stunde Infektionsdauer waren ca. 28% der Vakuolen TGTP und ca. 22% IIGP positiv. Davon waren 17% gleichzeitig positiv für IIGP und TGTP. Bei einer Infektionsdauer von 2 h beliefen sich diese Werte auf ca. 20% für TGTP und ca. 17% für IIGP. 12% der Vakuolen waren positiv für beide GTPasen. Nach 4 h konnte ein weiterer Abfall auf ca. 15% für TGTP beobachtet werden, während IIGP konstant bei ca. 17% blieb. Der Prozentsatz doppelt positiver war hierbei auf rund 7% gefallen.

Man erkennt deutlich eine schwächere Rekrutierung von IIGP und TGTP bei längerer Infektionsdauer, wobei die Rekrutierung von TGTP im Vergleich zu IIGP stärker abnimmt. Von 2 h auf 4 h bleibt die Anzahl IIGP positiver Vakuolen konstant, wohingegen sie bei TGTP um 5% sinkt, ein Aspekt, der mit den Einzel-Immunfärbungen für TGTP übereinstimmt. Dies könnte auf ein zeitlich abgestuftes Rekrutierungsschema für die einzelnen p47 GTPasen hindeuten.

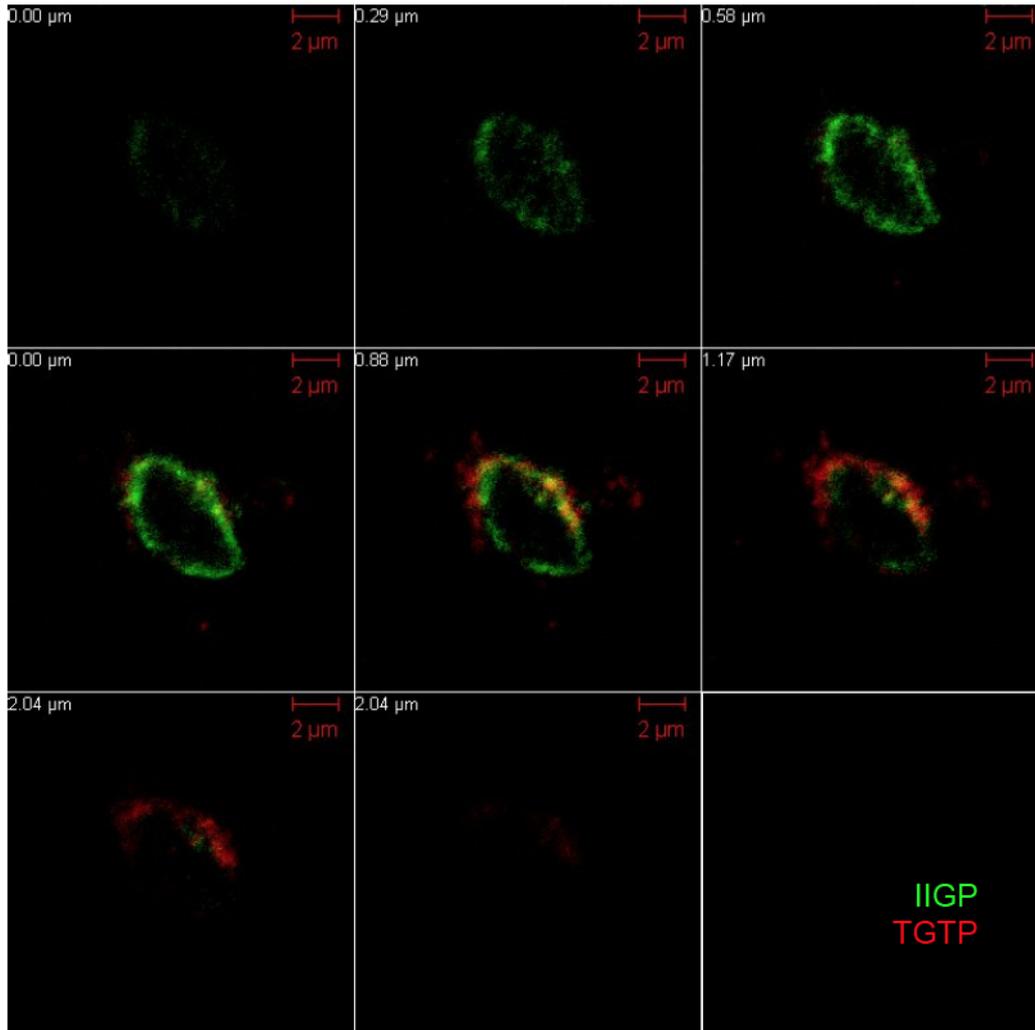


Abb. 23: Schichtaufnahme der Lokalisation von IIGP+TGTP an der PV von ME49 Toxoplasmen
 6×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion mit 1×10^7 Toxoplasmen wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen erneut für eine Stunde inkubiert. Nach Fixierung mit 3% Paraformaldehyd wurden die Deckgläschen sowohl mit anti-TGTP-Ak als auch mit anti-IIGP-Ak immungefärbt. Aufnahmen entstanden schichtweise am Konfokalen-Lasermikroskop.

Abb. 23 zeigt die Akkumulation der beiden GTPasen an der PV in unterschiedlichen Schnittebenen. IIGP und TGTP kolokalisieren, hier als gelb zu erkennen, nur teilweise. In mehreren Schichten ist nur eine der beiden GTPasen zu erkennen. Des Weiteren fällt auf, dass beide GTPasen ein relativ zirkuläres Band um die PV bilden und nicht diffus von allen Seiten an der PV akkumulieren. Die TGTP Verteilung scheint im Gegensatz zur IIGP Lokalisation räumlich begrenzter aufzutreten.

3.7 Zusammenhang der p47 GTPasen Akkumulation an der parasitophoren Vakuole und GRA7

Nachdem für verschiedene Toxoplasmen-Stämme die Rekrutierung von IIGP und TGTP untersucht wurde, sollte ein besonderes Augenmerk auf die dazugehörigen GRA7 positiven Vakuolen gelegt werden. Wie anfangs bereits beschrieben, kann GRA7 als Marker für die Integrität der Vakuolen benutzt werden. Demzufolge ist die Abnahme GRA7 positiver Vakuolen und die Signalzunahme im Wirtszellzytoplasma mit der potentiellen Zerstörung der PV und damit der Toxoplasmen gleichzusetzen. Geprüft werden sollte hierbei, ob die Abnahme der GRA7 positiven Vakuolen mit der Akkumulation der p47 GTPasen IIGP und TGTP korreliert.

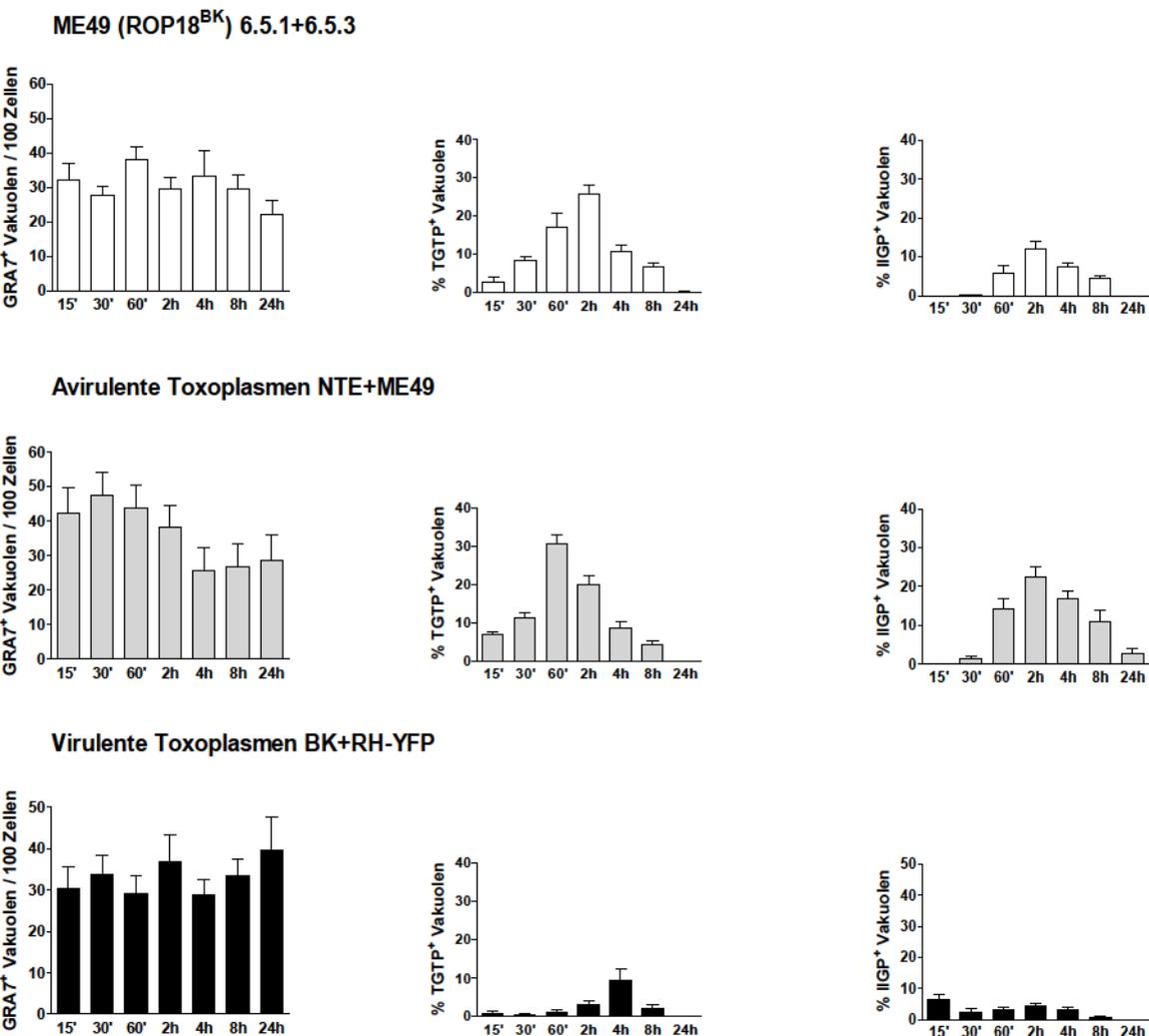


Abb. 24: Übersicht der GTPasen-Rekrutierung und der GRA7 positiven Vakuolen

Es wurden jeweils aus den beiden avirulenten bzw. virulenten Toxoplasmen-Stämmen sowie aus den beiden ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmenklonen Mittelwerte für TGTP, IIGP und GRA7 positive Vakuolen gebildet.

Abb. 24 zeigt für avirulente Stämme einen Rückgang der GRA7 positiven Vakuolen auf 100 Zellen von 45 auf 25 in einem Zeitraum von 30 min bis 4 h. In diesem Zeitraum ist ebenfalls für beide GTPasen die stärkste Rekrutierung an die PV zu erkennen. Im Gegensatz dazu, ist bei den virulenten Stämmen eine leichte Zunahme der GRA7 positiven Vakuolen nach 24 h zu verzeichnen. Während in avirulenten Toxoplasmen die Abnahme der GRA7 positiven Vakuolen mit der Akkumulation der p47 GTPasen IIGP und TGTP korreliert, ist in virulenten und ME49 (ROP18^{BK}) keine Abnahme der GRA7 positiven Vakuolen zu beobachten.

Somit kann für avirulente Toxoplasmen die Theorie bestätigt werden, dass eine erhöhte GTPasen Akkumulation mit einem Verlust an GRA7 und somit wahrscheinlich mit der Zerstörung des Parasiten einhergeht. Für virulente Toxoplasmen, für die nur eine geringfügige GTPasen Rekrutierung stattfindet, lässt sich keine Abnahme des GRA7 Signals beobachten. Bei den ME49 (ROP18^{BK}) sieht man eine verstärkte GTPasen Akkumulation an der PV, wie bei avirulenten Toxoplasmen, jedoch kann keine Reduktion im GRA7 Signal detektiert werden. Demzufolge müssen neben den hier untersuchten p47 GTPasen noch weitere Mechanismen die Eliminierung des Parasiten verursachen.

4 Anzahl der Toxoplasmen in einer parasitophoren Vakuole nach 24 Stunden

Die Virulenz von *T. gondii* ist unter anderem auch davon abhängig wie schnell der Parasit innerhalb der PV repliziert. Deshalb wurde abschließend die Toxoplasmen-Proliferation innerhalb der einzelnen PV untersucht. Hierzu wurden nach einer Infektionsdauer von 24 h die Anzahl an Parasiten pro Vakuole für die unterschiedlichen Toxoplasmenstämme gezählt und miteinander verglichen.

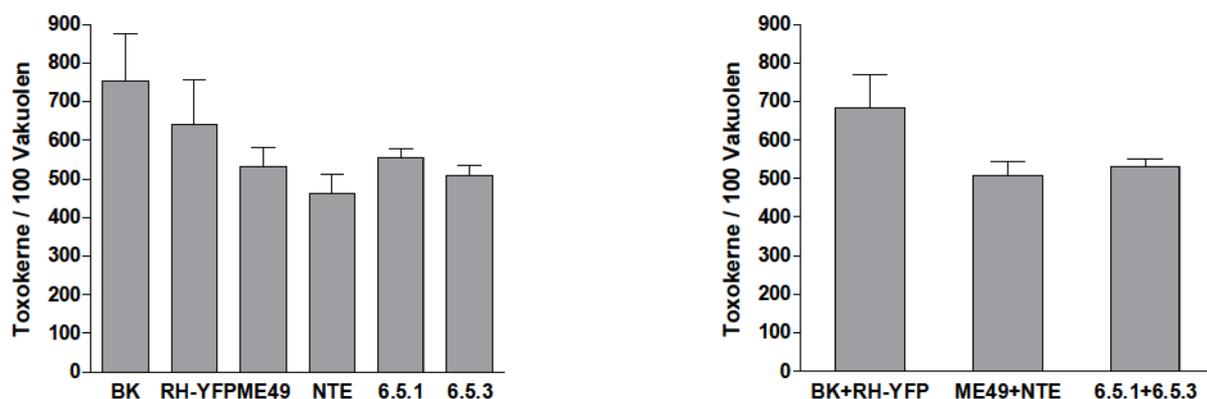


Abb. 25: Anzahl der Toxoplasmen pro Vakuole nach 24 h

6×10^5 Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 h vor Infektion mit 1×10^7 Toxoplasmen wurden die Astrozyten mit 100 U/ml IFN- γ vorstimuliert. Nach 15 min Pulsinfektion wurden alle extrazellulären Toxoplasmen mit PBS abgewaschen und die Deckgläschen

erneut für 24 h inkubiert. Nach Fixierung und Immunfärbung der Wirtszell- und Toxoplasmen-Kerne mittels DAPI wurden Toxoplasmenkerne pro Vakuole gezählt. In der rechten Grafik wurden jeweils Mittelwerte gebildet.

Wie in Abb. 25 zu erkennen, ist die intrazelluläre Proliferation von virulenten im Vergleich zu avirulenten etwas erhöht. Für BK und RH-YFP Toxoplasmen liegt sie im Mittel um sieben Parasiten pro Vakuolen, wohingegen bei NTE und ME49 Toxoplasmen nur fünf Parasiten pro Vakuole nach 24 h nachweisbar sind.

Für ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen sind ebenfalls fünf Parasiten pro Vakuole nachzuweisen. ME49 (ROP18^{BK}) Toxoplasmen gleichen in ihrem Proliferationsverhalten zu dem hier untersuchten Zeitpunkt eher avirulenten als virulenten Toxoplasmen. Insofern scheint das virulente ROP18 Gen in ME49 Toxoplasmen nicht zu einer erhöhten Proliferationsfähigkeit des Parasiten zu führen.

V Diskussion

T. gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der in der Lage ist, alle kernhaltigen Zellen zu infizieren (Sibley, 2003). Die Infektion mit dem Parasiten führt zu einer Vielzahl von Abwehrmechanismen, wobei die zelluläre Immunantwort ausschlaggebend ist (Lieberman und Hunter, 2002). Hierbei spielen besonders die IFN- γ vermittelten Effektormechanismen eine wichtige Rolle. Dazu zählen die Eisen,- Tryptophanverarmung, die NO und ROI Bildung und die p47 GTPasen.

IFN- γ induzierte Abwehrmechanismen unterscheiden sich je nach Zelltyp. Professionell phagozytierende Zellen des Immunsystems, wie z.B. Makrophagen, besitzen mehrere Möglichkeiten zur Bekämpfung von Parasiten. Ein wesentlicher Mechanismus hierbei ist NO vermittelt (Adams et al., 1990). Dieser stark toxoplasmazide Effektormechanismus trägt in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) (Mai, 2006) und Astrozyten (Halonen et al., 1998) jedoch nicht zur Resistenz gegen *T. gondii* bei. Für humane Fibroblasten konnte schon vor langer Zeit derIDO vermittelte Abbau von Tryptophan als wesentlicher Resistenzmechanismus identifiziert werden (Daubener und MacKenzie, 1999; Pfefferkorn, 1984). Für MEF (Mai, 2006) und murine Astrozyten (Halonen et al., 1998) hingegen konnte IDO vermittelte Abwehr gegen *T. gondii* ausgeschlossen werden.

Hinsichtlich der fatalen Auswirkungen der Krankheit Toxoplasmose im zentralen Nervensystem, sollten in dieser Arbeit vornehmlich die Abwehrmechanismen hirnrésidenter Astrozyten untersucht werden. Die ungehemmte Proliferation von Tachyzoiten im ZNS führt zu einer oftmals letal verlaufenden Enzephalitis, wohingegen Tachyzoiten, z.B. im Muskelgewebe, nur begrenzt Schaden verursachen. Bei der Präparation der Astrozytenkultur wurden Mikroglia (Makrophagen des Gehirns) depletiert, um deren bereits gut untersuchte Abwehreffekte auszuschließen.

1 Interferon- γ abhängige Hemmung der Proliferation virulenter und avirulenter Toxoplasmen

Es ist bekannt, dass Makrophagen die Proliferation avirulenter und virulenter Toxoplasmen IFN- γ abhängig hemmen. Vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass IFN- γ stimulierte Astrozyten wie auch MEF virulente Toxoplasmen in ihrem Wachstum nicht hemmen können. Für die beiden virulenten Toxoplasmen-Stämme RH-YFP und BK konnten diese Ergebnisse in IFN- γ stimulierten Astrozyten reproduziert werden. Im

Gegensatz dazu zeigte die Arbeitsgruppe von Halonen für den avirulenten Stamm ME49 eine deutlich IFN- γ abhängige Hemmung der Proliferation in murinen Astrozyten (Halonen et al., 1998). Es stellte sich nun die Frage, ob auch andere avirulente Toxoplasmen-Stämme einer IFN- γ abhängigen Wachstumshemmung unterliegen. In der Tat konnte das in dieser Arbeit für zwei weitere avirulente Stämme (76K und NTE) gezeigt werden (Abb. 7). Diese Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass in murinen Astrozyten auch weitere avirulente Stämme einem IFN- γ bedingten Hemmeffekt unterliegen. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass alle avirulenten Toxoplasmen in ihrer Proliferation durch IFN- γ stimulierte Astrozyten gehemmt werden können. Diese Vermutung stimmt mit der Beobachtung überein, dass schwerwiegende Entzündungen des ZNS, bedingt durch eine ungehemmte Proliferation der Tachyzoiten, vornehmlich durch den virulenten Typ I und nicht durch avirulente Toxoplasmen-Stämme bedingt sind (Sibley et al., 1999). Da Astrozyten keineIDO oder NO vermittelten Abwehrmechanismen besitzen, sollte im Folgenden getestet werden, inwieweit die GTPasen an diesem Prozess beteiligt sind.

2 Die Rekrutierung der p47 GTPasen an die parasitophore Vakuole virulenter und avirulenter Toxoplasmen

Die Proliferation avirulenter Toxoplasmen in murinen Astrozyten wird IFN- γ abhängig gehemmt. Es wurde beobachtet, dass die 47 kD GTPase IIGP vermehrt an avirulenten Toxoplasmen akkumuliert (Mai, 2006). Daher sollten nun diese Stämme im Hinblick auf die IFN- γ induzierten p47 GTPasen als mögliche Ursache für diese Hemmung untersucht werden.

In vorausgegangenen Arbeiten (Mai, 2006) wurden je ein virulenter (ME49) und ein avirulenter (BK) Stamm zu drei unterschiedlich späten Infektionszeitpunkten (2 h, 6 h und 24 h) untersucht. Bei dem virulenten BK Stamm konnte zu diesen Zeitpunkten eine stark verminderte Rekrutierung von IIGP an die PV gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte das unterschiedliche Verhalten der p47 GTPase IIGP bei Infektion mit avirulenten bzw. virulenten Toxoplasmen bestätigt werden. Zusätzlich zu den bereits untersuchten Stämmen BK (virulent) und ME49 (avirulent) wurden hier noch zwei weitere Stämme RH-YFP (virulent) und NTE (avirulent) betrachtet. Neben der p47 GTPase IIGP wurde ebenfalls die Rekrutierung der p47 GTPase TGTP charakterisiert.

Wie in Abb. 14 und Abb. 20 zu sehen ist, konnte für beide untersuchten GTPasen (IIGP, TGTP) an beiden virulenten Stämmen (RH-YFP, BK) im Vergleich zu den avirulenten Stämmen NTE und ME49 eine verminderte Rekrutierung an die PV beobachtet werden. Die

Auswertung der Kinetik im Zeitraum 15 min bis 24 h zeigte, dass die Rekrutierung an allen Messpunkten vermindert gewesen ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass avirulente Toxoplasmen durch IFN- γ stimulierte Astrozyten gehemmt werden und eine verstärkte GTPasen-Rekrutierung aufweisen, während virulente Stämme eine reduzierte GTPasen-Akkumulation an der PV zeigen und ungehindert in IFN- γ stimulierten Astrozyten proliferieren .

3 Manipulation der parasitophoren Vakuole durch virulente Toxoplasmen

Es stellt sich die Frage, wie die deutlichen Unterschiede zwischen virulenten und avirulenten Toxoplasmen in Bezug auf IFN- γ abhängige Wachstumshemmung einerseits, und GTPasen-Rekrutierung andererseits zustande kommen.

Es konnte schon vielfach gezeigt werden, dass *T. gondii* in der Lage ist, die Signaltransduktion der Wirtszelle zu manipulieren. So wird z.B. die Kerntranslokation von NF- κ B verhindert - und damit dem Parasiten das Eindringen in die Zelle ermöglicht - ohne verstärkt proinflammatorische Zytokine zu induzieren (Butcher et al., 2001). Des Weiteren wird durch Hemmung des IFN- γ Signalwegs eine ganze Reihe von Wirtzellabwehrmechanismen supprimiert. So konnte in Makrophagen gezeigt werden, dass durch *T. gondii* Tachyzoiten die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 gehemmt und damit letztendlich die Expression von Genen für z.B. iNOS oder IIGP unterdrückt wird (Kim et al., 2007; Zimmermann et al., 2006).

Es gilt nun zu untersuchen, wie virulente im Gegensatz zu avirulenten Toxoplasmen in der Lage sind, die Wirtszelle bezüglich der GTPasen-Rekrutierung zu manipulieren. Einerseits könnte eine reduzierte GTPasen-Akkumulation durch Veränderungen der Wirtszelle und ihrer Abwehrmechanismen bedingt sein, andererseits jedoch könnte die einzelne PV avirulenter und virulenter Toxoplasmen unterschiedlich modifiziert sein und so die Rekrutierung aktiv verhindert werden.

Um dies näher zu analysieren, wurden koinfizierte Wirtszellen untersucht, in denen je ein virulenter und ein avirulenter Parasit zusammen enthalten waren. Die Experimente zeigten, dass die GTPasen-Rekrutierung an die avirulente PV durch die gleichzeitige Anwesenheit virulenter Toxoplasmen in der Zelle nicht gestört wurde. Auch andersherum blieb die gestörte Rekrutierung von virulenten Toxoplasmen durch avirulente Toxoplasmen in der Zelle unbeeinflusst. Dieses Ergebnis spricht gegen die Annahme, dass virulente Toxoplasmen die Wirtszelle manipulieren und so eine geringere p47 GTPasen-Akkumulation an der PV erzielt wird. Es lässt eher darauf schließen, dass sich die verminderte GTPasen-Rekrutierung auf der Ebene der individuellen PV abspielt und somit einen

vakuolenspezifischen Effekt darstellt. Es konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die PV virulenter und avirulenter Toxoplasmen auch in Makrophagen unabhängige GTPasen Rekrutierung zeigt (Zhao et al., 2009). Die PV trägt bereits bei ihrer Entstehung durch ausselektierte wirtszellspezifische Proteine wesentlich dazu bei, dass der Parasit nicht dem lysosomalen System zum Opfer fällt. Durch die verminderte p47 GTPasen-Rekrutierung kann ein weiterer schützender Mechanismus an der PV vermutet werden, der maßgeblich zum Überleben virulenter Parasiten beiträgt.

4 Die p47 GTPasen

Um die Auswirkung der Rekrutierung der unterschiedlichen GTPasen an der PV von virulenten und avirulenten Toxoplasmen diskutieren zu können, sollen hier die bisher bekannten Mechanismen der p47 GTPasen bei der Kontrolle von *T. gondii* erläutert werden. Für die Abwehr der intrazellulären Toxoplasmen in Astrozyten wurde eine Beteiligung der p47 GTPasen bei der Reifung und der Ruptur der PV beschrieben. So wurde von der Arbeitsgruppe Howard die Reifung der GTPasen positiven PV an Hand der Morphologie ihrer unterschiedlichen Stadien als glatt, rau und rupturiert charakterisiert (Martens et al., 2005). Nach der Zerstörung der PV und damit des schützenden Kompartiments konnte IIGP Rekrutierung direkt an die Plasmamembran des Parasiten nachgewiesen werden, was vermutlich zu seiner Eliminierung führt (Martens et al., 2005). Des Weiteren konnte von der Arbeitsgruppe Ling gezeigt werden, dass in Makrophagen nach der GTPasen bedingten Zerstörung der PV ebenfalls die Toxoplasmenzellmembran degradiert wird, mit anschließender Autophagie des Parasiten (Ling et al., 2006). Die Rekrutierung von p47 GTPasen an die PV wird somit mit der unmittelbaren Immunabwehr von *T. gondii* assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von p47 GTPasen (IGTP, GTPI, TGTP und IRG-47) stark mit der PV assoziieren (Martens et al., 2005). Der PV als primärer Angriffspunkt der GTPasen kommt hier also eine Schlüsselrolle zu.

4.1 Kinetik der IIGP und TGTP Rekrutierung an die parasitophore Vakuole

Vorergebnisse unserer Arbeitsgruppe für die IIGP Rekrutierung an BK und ME49 Toxoplasmen lagen nur für späte Zeitpunkte (2 h, 6 h, 24 h) vor. Wie in Abschnitt V 2 bereits erwähnt, zeigen diese Daten für den virulenten BK Stamm eine gestörte Rekrutierung der GTPase IIGP an die PV im Vergleich zum avirulenten ME49 Stamm. Diesbezüglich stellte sich die Frage, wie sich die GTPasen-Rekrutierung zu früheren Zeitpunkten darstellt. Hierfür

wurde in dieser Arbeit ein erweiterter Untersuchungszeitraum von 15 min bis hin zu 24 h gewählt. Als mögliche Ursache für die gestörte GTPasen-Rekrutierung an die PV von virulenten Toxoplasmen wurde einerseits diskutiert, dass die GTPasen virulente PV generell nicht erkennen oder schlechter an sie binden können, andererseits könnten GTPasen sehr früh von der Vakuole wieder abgestoßen werden. Für letztere Theorie sprechen die Ergebnisse des RH Stamms in Abb. 14. Hier erkennt man zum frühesten gemessenen Zeitpunkt (15 min) die maximale Rekrutierung von IIGP, die bereits nach 30 min um ca. 50% reduziert ist. Jedoch sind nur maximal 10% der PV IIGP positiv, was deutlich vermindert ist im Vergleich zu avirulenten Toxoplasmen. Bei der Untersuchung eines weiteren virulenten Stamms BK zeigte sich jedoch zu allen Zeitpunkten eine konstant niedrige IIGP sowie TGTP Rekrutierung. Damit ist es unwahrscheinlich, dass virulente Toxoplasmen die GTPasen in der frühen Phase der Infektion wieder abstoßen.

Vergleicht man die Rekrutierung der beiden GTPasen IIGP und TGTP bei avirulenten Toxoplasmen, so fallen in Abb. 24 unterschiedliche Zeitpunkte der maximalen Rekrutierung auf. Das Verteilungsmuster ist jedoch ähnlich pyramidenförmig, es scheint lediglich für IIGP etwas zu späteren Zeitpunkten hin verlagert zu sein.

Ein ähnliches Ergebnis ist in Abb. 22 an Hand der Simultanfärbung von IIGP und TGTP zu sehen. Die Akkumulation von TGTP an der PV sinkt stetig im zeitlichen Verlauf, wohingegen IIGP zu späteren Zeitpunkten konstant bleibt. Bei den frühen Werten lag die Akkumulation von TGTP über der von IIGP, während bei 4 h die IIGP Rekrutierung die von TGTP übertraf. Diese Beobachtung könnte auf ein zeitlich versetztes Rekrutierungsschema der GTPasen hindeuten.

Es stellt sich nun die Frage wie es bei avirulenten Toxoplasmen zu einer stetig ansteigenden Akkumulation von IIGP und TGTP bis zu einem Maximalwert und anschließend wieder zu stetiger Abnahme der GTPasen an der PV kommen kann. Für dieses - im vorigen als pyramidenförmig beschriebenes - Rekrutierungsverhalten lassen sich zwei Theorien aufstellen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass sich die GTPasen nach einer bestimmten Verweildauer wieder von der PV entfernen, oder abgestoßen werden. Zum anderen ist es ebenfalls denkbar, dass die GTPasen die PV zerstört haben und daher nach einiger Zeit weniger positive PV vorhanden sind. Die Ergebnisse von Melzer und Martens deuten darauf hin, dass die GTPasen zu frühen Zeitpunkten (1-2 h) ihre schädigende Wirkung an der PV in Astrozyten ausüben (Martens et al., 2005; Melzer et al., 2008). Zwischen 1 h und 2 h konnte auch in dieser Arbeit für IIGP und TGTP eine maximale Rekrutierung an die PV beobachtet werden. Ein definitiver Nachweis für die Zerstörung des Parasiten steht noch aus, jedoch weisen die in Abschnitt IV 3.7 beschriebenen Experimente auf eine Reduktion der Vakuolen nach 4 h hin.

4.2 Lokalisation von IIGP und TGTP an die parasitophore Vakuole

Des Weiteren zeigte sich (Abb. 22), dass IIGP und TGTP nicht immer an der gleichen PV lokalisieren, obwohl es einen großen Anteil von sowohl IIGP als auch TGTP positiven Vakuolen gibt. Das bedeutet, dass sowohl nur IIGP positive als auch nur TGTP positive Vakuolen vorhanden sind.

Weitergehende Untersuchungen am Konfokalen-Laser-Mikroskop sollten zeigen, ob an doppelt positiven Vakuolen IIGP und TGTP an den gleichen Stellen der PV oder räumlich getrennt lokalisieren. In Abb. 23 kann man erkennen, dass beide Möglichkeiten teilweise zutreffen. IIGP und TGTP kolokalisieren an der PV, es gibt jedoch Areale in denen jeweils nur eine der GTPasen zu finden ist.

Die Zeitpunkte der maximalen GTPasen-Rekrutierung unterscheiden sich zwischen IIGP und TGTP wie im vorherigen Abschnitt erwähnt. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass die PV einem Entwicklungsprozess unterliegt, und die eine GTPase die Grundlage für das Angreifen der anderen schafft, zumal die beiden GTPasen teilweise örtlich kolokalisieren. In diesem Szenario würde eine GTPase die andere ablösen. Dies könnte eine bestimmte Reihenfolge der Rekrutierung der GTPasen voraussetzen. Hierfür wären weitere Experimente mit anderen p47 GTPasen wichtig. Wie in Abschnitt V 4 bereits beschrieben gibt es eine Vielzahl von p47 GTPasen, die an der PV lokalisieren. Dabei wäre es von großem Interesse, inwiefern diese GTPasen miteinander kolokalisieren, und ob zeitliche Unterschiede in der maximalen Rekrutierung existieren.

Es wurde bereits erwähnt, dass z.B. LRG-47 zusammen mit GTPI und IGTP für die korrekte Lokalisation weiterer GTPasen benötigt wird (Hunn et al., 2008). Dabei stellt sich die Frage, ob jede TGTP positive PV im zeitlichen Verlauf auch IIGP positiv wird oder ob es drei voneinander unabhängige Populationen gibt - nur IIGP oder TGTP positive und gemischt positive PV. Hierzu könnte man Astrozyten mit IIGP und TGTP transfizieren, die jeweils mit unterschiedlicher Immunfluoreszenz (z.B. GFP und DsRed) markiert sind. Nach IFN- γ Stimulation und Infektion mit *T. gondii* müsste man in einem Inkubator am Konfokalen-Laser-Mikroskop über einen längeren Zeitraum hinweg die Entwicklung einer PV beobachten.

4.3 GRA7 und die p47 GTPasen IIGP und TGTP

Aus den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Martens lässt sich schlussfolgern, dass p47 GTPasen vermutlich wesentlich daran beteiligt sind, die den Parasiten schützende PV zu zerstören. Die GTPasen formen eine als „membrane attack complex“ beschriebene Struktur. Die Veränderung an der PV durch die GTPasen wird als Reifungsprozess beschrieben. Der

Reifungsprozess, bis hin zur Zerstörung der PV, korreliert stark mit der Signalintensität des Dense Granula Protein GRA7. Dieses Protein, welches bei der Invasion des Toxoplasmen sekretiert wird, und in der PV an das Intravakuoläre-Netzwerk sowie die PVM assoziiert, kolokalisiert mit den GTPasen IIGP und TGTP. Die Signalintensität des GRA7 Proteins nimmt mit zunehmenden Reifungsgrad der PV ab und findet sich nach Zerstörung der PV zytosolisch in der Wirtszelle wieder (Martens et al., 2005).

Ausgehend von den vorausgegangen Ergebnissen dieser Arbeit, dass avirulente Toxoplasmen durch IFN- γ stimulierte Astrozyten gehemmt werden und eine verstärkte GTPasen-Rekrutierung aufweisen, müssten also die GRA7 positiven Vakuolen im Verlauf der Zeit abnehmen. Im Gegensatz dazu sollte die Anzahl von GRA7 positiven Vakuolen bei virulenten Toxoplasmen relativ konstant bleiben. Diese Theorie konnte mit Experimenten in Abb. 24 bestätigt werden. Im Gegensatz zu den virulenten sieht man bei den avirulenten Toxoplasmen eine deutliche Abnahme der GRA7 positiven Vakuolen. Zu den frühen Zeitpunkten (15 min-2 h) erkennt man hier ca. 45 GRA7 positive Vakuolen auf 100 Zellen, wohingegen bereits nach 4 h die Anzahl auf ca. 25 gesunken ist und sich nach 8 h bis 24 h nicht mehr weiter verändert. In nicht IFN- γ stimulierten Zellen konnten keine GRA7 positiven Wirtszellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammen mit den oben erwähnten Vorergebnissen der Arbeitsgruppe Martens lässt sich hier der Verdacht erhärten, dass die p47 GTPasen im Zusammenhang mit der Zerstörung der PV avirulenter Toxoplasmen stehen.

5 ROP18 und die p47 GTPasen IIGP und TGTP

Erst kürzlich wurde das Protein eines „Virulenzgens“ auf Chromosom VIIa, das ROP18, identifiziert und beschrieben. Diese Virulenz wurde an der Sterblichkeit von Mäusen nach i.p. Injektion von Toxoplasmen gemessen. Dazu wurden avirulente Toxoplasmen mit dem ROP18 Allel aus virulenten Toxoplasmen transfiziert. Diese Parasiten waren um bis zu 5 log Stufen virulenter als der Wildtyp in der Maus (Taylor et al., 2006).

Da virulente Toxoplasmen eine reduzierte GTPasen-Rekrutierung besitzen und ROP18 als Virulenzfaktor beschrieben wurde, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob das virulente ROP18 Allel, transfiziert in avirulente Toxoplasmen, zu einer verminderten GTPasen-Rekrutierung führt.

Von den so erzeugten ME49 Transfektanten mit dem virulenten ROP18 Allel aus BK Toxoplasmen ME49 (ROP18^{BK}) wurden zwei Klone (6.5.1 und 6.5.3) untersucht.

Zunächst sollten diese beiden Klone hinsichtlich ihres Verhaltens bei der GTPasen-Rekrutierung verglichen werden.

Hinsichtlich der IIGP Rekrutierung an die PV unterscheiden sich die beiden Klone kaum voneinander (Abb. 19). Im Kontrast dazu ist die Akkumulation von TGTP an der PV, bei beiden Klonen sehr unterschiedlich. Wie in Abb. 21 gezeigt, ist zwar das Verteilungsmuster ähnlich, und zeigt eine gleichzeitige maximale Rekrutierung, quantitativ jedoch unterscheiden sich die beiden Klone deutlich in der Rekrutierung von TGTP an die PV. Auf Grund dieser Beobachtung wäre es interessant in weiterführenden Experimenten, z.B. mit einer quantitativen PCR, die Menge an transfiziertem ROP18 zu bestimmen. Eventuell lässt sich so der Unterschied zwischen den beiden Klonen für TGTP erklären.

Vergleicht man nun die Mittelwerte der Klone 6.5.1 und 6.5.3 mit dem ME49 Wildtyp in Abb.26, erkennt man vom Verteilungsmuster im zeitlichen Verlauf keinen Unterschied. Allerdings ist bei den ME49 (ROP18^{BK}) Transfektanten die IIGP Rekrutierung quantitativ deutlich reduziert. Besonders zu frühen Zeitpunkten (1-2 h) sieht man hier eine bis zu 50%ige Reduzierung der GTPase IIGP (Abb.26). Hieraus könnte man ableiten, dass ROP18 besonders in der frühen Phase der Infektion seine Wirkung entfaltet.

Es konnte gezeigt werden, dass ROP18 synthetisiert und innerhalb der Toxoplasmen korrekt lokalisiert wird (siehe Abb. 12 und 13). Allerdings steht ein funktioneller Nachweis noch aus. Die in der Literatur beschriebene gesteigerte Proliferationsrate der Transfektanten gegenüber dem Wildtyp (Taylor et al., 2006) konnte hier nicht nachgewiesen werden, (siehe Abb. 25).

In der Zellkultur teilen die Transfektanten die Eigenschaften von virulenten Toxoplasmen z.B. bezüglich der vollständigen Lyse des Monolayers. Es war jedoch nicht möglich, diese Beobachtungen zu quantifizieren. Ein sinnvoller nächster Schritt, um die Transfektanten näher zu charakterisieren, wäre die i.p. Infektion von Mäusen. Dazu vergleicht man die letale Dosis von ME49 (ROP18^{BK}) Transfektanten mit ME49 und BK in der Maus, um die Virulenz der Transfektanten genauer charakterisieren zu können.

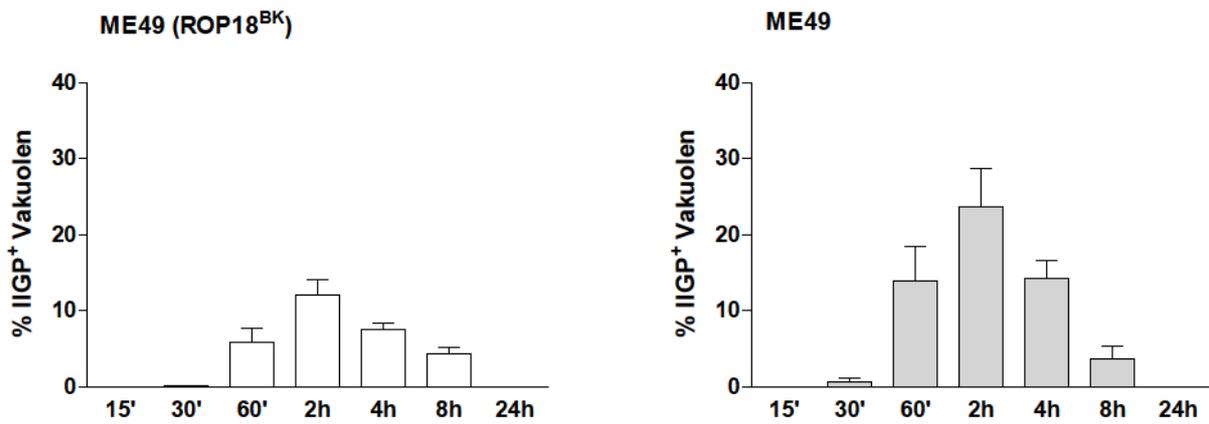


Abb. 26: Kinetik der IIGP Rekrutierung an die PV bei ME49 (ROP18^{BK}) und ME49 Toxoplasmen
 Es wurde aus beiden ME49 (ROP18^{BK}) Klonen ein Mittelwert gebildet und hier im Vergleich zum Mittelwert der ME49 Wildtyp aufgetragen.

Im Gegensatz zu IIGP zeigt die Rekrutierung von TGTP an die PV keinen Einfluss durch das ROP18 BK Allel. Man sieht in der TGTP Kinetik keine reduzierte Akkumulation der GTPasen an der PV zwischen ME49 Wildtyp und ME49 (ROP18^{BK}) Transfektant siehe (Abb. 27). Allerdings ist das Rekrutierungs-Maximum bei den ME49 (ROP18^{BK}) verspätet (2 h) im Vergleich zu dem ME49 Wildtyp.

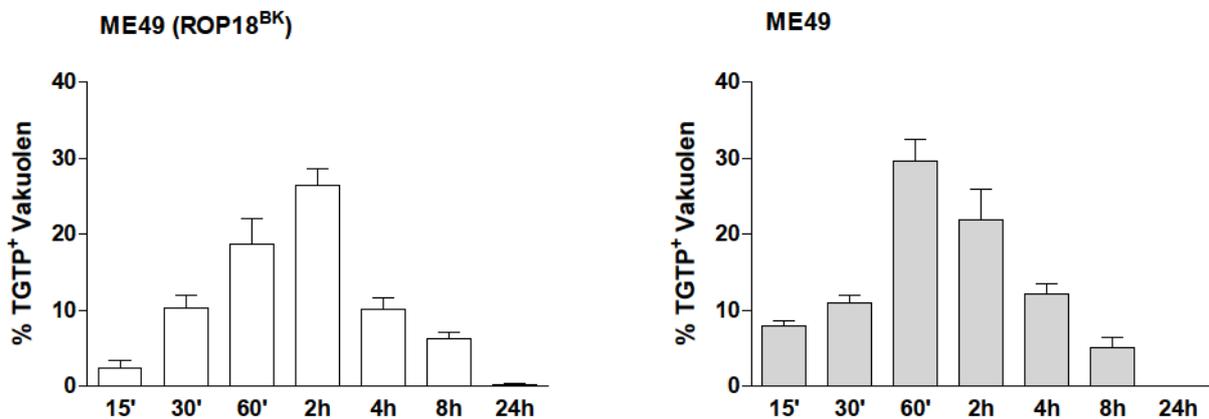


Abb. 27: Kinetik der TGTP Rekrutierung an die PV bei ME49 (ROP18^{BK}) und ME49 Toxoplasmen
 Es wurde aus beiden ME49 (ROP18^{BK}) Klonen ein Mittelwert gebildet und hier im Vergleich zum Mittelwert der ME49 Wildtyp aufgetragen.

Diese hier gezeigten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ROP18 keinen Einfluss auf die TGTP und nur schwachen Einfluss auf IIGP GTPasen-Rekrutierung hat und somit seine Virulenz in der Maus auf andere noch ungeklärte Art und Weise entfaltet. Dafür spricht auch, dass das GRA7 Signal der ME49 (ROP18^{BK}) sich im gemessenen Infektionszeitraum von 15 min bis 24 h nicht reduziert hat trotz vergleichbarer GTPasen Akkumulation.

VI Zusammenfassung

T. gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, durch dessen Infektion eine Kaskade von antiparasitären Effektormechanismen in den Wirtszellen ausgelöst wird. In den hier untersuchten murinen Astrozyten spielen die IFN- γ induzierbaren p47 GTPasen eine grundlegende Rolle in der Immunantwort gegen den Parasiten. Das Verhalten zweier dieser GTPasen, IIGP und TGTP, an der den Parasiten umgebenden Vakuole wurde in dieser Arbeit an Hand von mikroskopischen Beobachtungen in einem Zeitraum von 15 min bis 24 h näher charakterisiert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden avirulente (ME49) und virulente (BK) Toxoplasmen in Bezug auf ihr Proliferationsverhalten in IFN- γ stimulierten Astrozyten sowie auf die GTPasen-Rekrutierung an die PV untersucht. Hierbei zeigte sich, dass avirulente Toxoplasmen durch IFN- γ stimulierte Astrozyten gehemmt werden und eine verstärkte GTPasen-Rekrutierung aufweisen, während virulente Stämme eine reduzierte GTPasen-Akkumulation an der PV zeigen und ungehindert in IFN- γ stimulierten Astrozyten proliferierten. Darüber hinaus konnte die vermehrte GTPasen Akkumulation bei avirulenten Toxoplasmen in Zusammenhang mit einer verstärkten Eliminierung des Parasiten gebracht werden. Inwieweit virulente Toxoplasmen die vermindert GTPasen-Rekrutierung an die PV durch Modulation der Wirtszelle oder durch Manipulation der einzelnen PV erreichen, wurde mit Hilfe von Koinfektionsexperimenten untersucht. Bei gleichzeitiger Infektion mit virulenten und avirulenten Toxoplasmen zeigte sich, dass die verminderte GTPasen-Rekrutierung eine Eigenschaft der virulenten PV ist und nicht auf einen Eingriff in die Wirtszellsignaltransduktion beruht. Zusätzlich zur quantitativen Rekrutierung der GTPasen wurde auch die räumliche Anordnung von IIGP und TGTP an der PV untersucht. Neben Vakuolen, die nur IIGP oder TGTP positiv waren zeigten sich auch Vakuolen, die stellenweise eine Kolokalisation aufwiesen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von ROP18 - ein erst kürzlich entdecktes Virulenzgen - auf die GTPasen-Rekrutierung untersucht. Da virulente Toxoplasmen eine reduzierte GTPasen-Rekrutierung besitzen und ROP18 als Virulenzfaktor beschrieben wurde, sollte untersucht werden, ob die Expression des virulenten ROP18^{BK} in avirulenten ME49 Toxoplasmen die GTPasen-Rekrutierung beeinflusst. Erstaunlicherweise konnte in avirulenten Toxoplasmen, die das virulente ROP18 Allel trugen [ME49 (ROP18^{BK})] keine deutliche Verringerung von IIGP sowie TGTP an der PV gezeigt werden. Des Weiteren zeigte sich der Phänotyp des avirulenten Wildtyps ebenfalls in Bezug auf die intrazelluläre Proliferation. ROP18 transfizierte avirulente ME49 Toxoplasmen zeigten jedoch im Gegensatz zum avirulenten Wildtyp keine Reduktion der Parasitenzahl in der Wirtszelle. Die

Expression des virulenten ROP18 Allels in avirulenten ME49 vermindert somit durch einen für die untersuchten GTPase unabhängigen Mechanismus deren Eliminierung.

VII Literaturverzeichnis

- Adams LB, Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Krahenbuhl JL. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J.Immunol.* 144:2725-2729.
- Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J.Cell Biol.* 77:72-82.
- Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert.Rev.Mol.Med.* 2001:1-19.
- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS.Pathog.* 1:e17.
- Aliberti J. 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat.Rev.Immunol.* 5:162-170.
- Aliberti J, Reis e Sousa, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, Sher A. 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat.Immunol.* 1:83-87.
- Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis e Sousa, Fairlamb A, Ribeiro JM, Sher A. 2003. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat.Immunol.* 4:485-490.
- Aline F, Bout D, Dimier-Poisson I. 2002. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infect.Immun.* 70:2368-2374.
- Barragan A, Sibley LD. 2002. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J.Exp.Med.* 195:1625-1633.
- Barragan A, Sibley LD. 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 11:426-430.
- Beckers CJ, Dubremetz JF, Mercereau-Puijalon O, Joiner KA. 1994. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J.Cell Biol.* 127:947-961.
- Bekpen C, Hunn JP, Rohde C, Parvanova I, Guethlein L, Dunn DM, Glowalla E, Leptin M, Howard JC. 2005. The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* 6:R92.
- Black MW, Boothroyd JC. 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64:607-623.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect.Immun.* 61:1141-1145.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect.Immun.* 62:1761-1767.

- Boothroyd JC, Dubremetz JF. 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat.Rev.Microbiol.* 6:79-88.
- Boothroyd JC, Grigg ME. 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr.Opin.Microbiol.* 5:438-442.
- Bradley PJ, Sibley LD. 2007. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr.Opin.Microbiol.* 10:582-587.
- Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Collier S, Coombs GH, Dunn JD, Ferguson DJ, Sanderson SJ, Wastling JM, Boothroyd JC. 2005. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J.Biol.Chem.* 280:34245-34258.
- Brunet LR. 2001. Nitric oxide in parasitic infections. *Int.Immunopharmacol.* 1:1457-1467.
- Butcher BA, Greene RI, Henry SC, Annecharico KL, Weinberg JB, Denkers EY, Sher A, Taylor GA. 2005. p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages. *Infect.Immun.* 73:3278-3286.
- Butcher BA, Kim L, Johnson PF, Denkers EY. 2001. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J.Immunol.* 167:2193-2201.
- Carey KL, Jongco AM, Kim K, Ward GE. 2004. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot.Cell* 3:1320-1330.
- Carruthers V, Boothroyd JC. 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr.Opin.Microbiol.* 10:83-89.
- Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. 1999. Secretion of micronemal proteins is associated with *toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol.* 1:225-235.
- Cerede O, Dubremetz JF, Soete M, Deslee D, Vial H, Bout D, Lebrun M. 2005. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J.Exp.Med.* 201:453-463.
- Chardes T, Bout D. 1993. Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res.Immunol.* 144:57-60.
- Charron AJ, Sibley LD. 2004. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic.* 5:855-867.
- Collazo CM, Yap GS, Sempowski GD, Lusby KC, Tessarollo L, Woude GF, Sher A, Taylor GA. 2001. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J.Exp.Med.* 194:181-188.
- Combe CL, Curiel TJ, Moretto MM, Khan IA. 2005. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. *Infect.Immun.* 73:4913-4921.
- Darde ML. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann.Ist.Super.Sanita* 40:57-63.

- Daubener W, MacKenzie CR. 1999. IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv.Exp.Med.Biol.* 467:517-524.
- Daubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim KS, Schroten H. 2001. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect.Immun.* 69:6527-6531.
- Dimier,I.H.; Bout,D.T. 1998. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology.* 94: 488-495.
- Dobrowolski JM, Sibley LD. 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84:933-939.
- Dubey JP. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 28:1019-1024.
- Dubey JP, Frenkel JK. 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J.Protozool.* 19:155-177.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin.Microbiol.Rev.* 11:267-299.
- Dubremetz JF, Schwartzman JD. 1993. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res.Immunol.* 144:31-33.
- Dzierszynski F, Mortuaire M, Cesbron-Delauw MF, Tomavo S. 2000. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Mol.Microbiol.* 37:574-582.
- El Hajj H, Demey E, Poncet J, Lebrun M, Wu B, Galeotti N, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics.* 6:5773-5784.
- El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. 2007a. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS.Pathog.* 3:e14.
- El Hajj H, Lebrun M, Fourmaux MN, Vial H, Dubremetz JF. 2007b. Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cell Microbiol.* 9:54-64.
- Frenkel JK. 1973. *Toxoplasma* in and around us. *BioScience* 343-352.
- Frenkel JK, Escajadillo A. 1987. Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 36:517-522.
- Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, Alvar J. 2001. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J.Clin.Microbiol.* 39:1566-1570.
- Gavrilescu LC, Denkers EY. 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J.Immunol.* 167:902-909.

- Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.* 149:175-180.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.* 153:2533-2543.
- Ghosh A, Uthaiyah R, Howard J, Herrmann C, Wolf E. 2004. Crystal structure of IIGP1: a paradigm for interferon-inducible p47 resistance GTPases. *Mol.Cell* 15:727-739.
- Gilbert LA, Ravindran S, Turetzky JM, Boothroyd JC, Bradley PJ. 2007. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryot.Cell* 6:73-83.
- Gilly M, Wall R. 1992. The IRG-47 gene is IFN-gamma induced in B cells and encodes a protein with GTP-binding motifs. *J.Immunol.* 148:3275-3281.
- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. 2001a. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294:161-165.
- Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. 2001b. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J.Infect.Dis.* 184:633-639.
- Gubbels MJ, Li C, Striepen B. 2003. High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47:309-316.
- Hakansson S, Charron AJ, Sibley LD. 2001. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 20:3132-3144.
- Hakansson S, Morisaki H, Heuser J, Sibley LD. 1999. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol.Biol.Cell* 10:3539-3547.
- Halonen SK, Chiu F, Weiss LM. 1998. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect.Immun.* 66:4989-4993.
- Halonen SK, Taylor GA, Weiss LM. 2001. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infect.Immun.* 69:5573-5576.
- Halonen SK, Weiss LM. 2000. Investigation into the mechanism of gamma interferon-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect.Immun.* 68:3426-3430.
- Hanks SK, Hunter T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9:576-596.
- Herion P, Hernandez-Pando R, Dubremetz JF, Saavedra R. 1993. Subcellular localization of the 54-kDa antigen of *Toxoplasma gondii*. *J.Parasitol.* 79:216-222.
- Howe DK, Sibley LD. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J.Infect.Dis.* 172:1561-1566.
- Howe DK, Summers BC, Sibley LD. 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect.Immun.* 64:5193-5198.

- Hunn JP, Koenen-Waisman S, Papic N, Schroeder N, Pawlowski N, Lange R, Kaiser F, Zerrahn J, Martens S, Howard JC. 2008. Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 27:2495-2509.
- Jackson MH, Hutchison WM. 1989. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv.Parasitol.* 28:55-105.
- Jones TC, Bienz KA, Erb P. 1986. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infect.Immun.* 51:147-156.
- Kasper LH, Buzoni-Gatel D. 1998. Some Opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. *Parasitol.Today* 14:150-156.
- Keeley A, Soldati D. 2004. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* 14:528-532.
- Khan A, Su C, German M, Storch GA, Clifford DB, Sibley LD. 2005. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J.Clin.Microbiol.* 43:5881-5887.
- Khan IA, Schwartzman JD, Matsuura T, Kasper LH. 1997. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:13955-13960.
- Kim SK, Fouts AE, Boothroyd JC. 2007. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J.Immunol.* 178:5154-5165.
- Kissinger JC, Gajria B, Li L, Paulsen IT, Roos DS. 2003. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acids Res.* 31:234-236.
- Kyhse-Anderson J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods* 203-209.
- Lebrun M., Carruthers V.B., and Cesbron-Delauw M.F. (2007). *Toxoplasma* Secretory Proteins and their Roles in Cell Invasion and Intracellular Survival. In *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*, Academic Press), pp. 265-307.
- Lebrun M, Michelin A, El Hajj H, Poncet J, Bradley PJ, Vial H, Dubremetz JF. 2005. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol.* 7:1823-1833.
- Lieberman LA, Hunter CA. 2002. The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Int.Rev.Immunol.* 21:373-403.
- Lindberg RE, Frenkel JK. 1977. Toxoplasmosis in nude mice. *J.Parasitol.* 63:219-221.
- Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, Yap GS. 2006. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J.Exp.Med.* 203:2063-2071.
- Lingelbach K, Joiner KA. 1998. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J.Cell Sci.* 111 (Pt 11):1467-1475.

- Lovett JL, Marchesini N, Moreno SN, Sibley LD. 2002. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J.Biol.Chem.* 277:25870-25876.
- Mai C. 2006. Antiparasitäre Aktivität muriner Astrozyten und Fibroblasten.
- Manger ID, Hehl AB, Boothroyd JC. 1998. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect.Immun.* 66:2237-2244.
- Martens S, Parvanova I, Zerrahn J, Griffiths G, Schell G, Reichmann G, Howard JC. 2005. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS.Pathog.* 1:e24.
- Martens S, Sabel K, Lange R, Uthaiiah R, Wolf E, Howard JC. 2004. Mechanisms regulating the positioning of mouse p47 resistance GTPases LRG-47 and IIGP1 on cellular membranes: retargeting to plasma membrane induced by phagocytosis. *J.Immunol.* 173:2594-2606.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg.Infect.Dis.* 5:607-625.
- Mehlhorn H and Walldorf V. (1988). Life cycles in parasitology in focus facts and trends. Springer Verlag, Berlin).
- Melzer T, Duffy A, Weiss LM, Halonen SK. 2008. The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for *Toxoplasma* vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infect.Immun.* 76:4883-4894.
- Mercier C, Howe DK, Mordue D, Lingnau M, Sibley LD. 1998. Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect.Immun.* 66:4176-4182.
- Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 39:23-39.
- Mineo JR, Kasper LH. 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp.Parasitol.* 79:11-20.
- Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363:1965-1976.
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. 1999a. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J.Exp.Med.* 190:1783-1792.
- Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley LD. 1999b. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp.Parasitol.* 92:87-99.
- Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J.Immunol.* 167:4574-4584.
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J.Cell Sci.* 108 (Pt 6):2457-2464.

- Murray HW, Rubin BY, Carriero SM, Harris AM, Jaffee EA. 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.* 134:1982-1988.
- Nguyen TD, Bigaignon G, Markine-Goriaynoff D, Heremans H, Nguyen TN, Warnier G, Delmee M, Warny M, Wolf SF, Uyttenhove C, Van Snick J, Coutelier JP. 2003. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon. *J.Med.Microbiol.* 52:869-876.
- Nichols BA, Chiappino ML, O'Connor GR. 1983. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J.Ultrastruct.Res.* 83:85-98.
- Ossorio PN, Dubremetz JF, Joiner KA. 1994. A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J.Biol.Chem.* 269:15350-15357.
- Ossorio PN, Schwartzman JD, Boothroyd JC. 1992. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol.Biochem.Parasitol.* 50:1-15.
- Parmley SF, Gross U, Sucharczuk A, Windeck T, Sgarlato GD, Remington JS. 1994a. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J.Parasitol.* 80:293-301.
- Parmley SF, Yang S, Harth G, Sibley LD, Sucharczuk A, Remington JS. 1994b. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol.Biochem.Parasitol.* 66:283-296.
- Pfefferkorn ER. 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81:908-912.
- Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC. 1976. *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp.Parasitol.* 39:365-376.
- Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC. 1977. Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J.Protozool.* 24:449-453.
- Reis e Sousa, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J.Exp.Med.* 186:1819-1829.
- Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* 21:476-481.
- Saeij JP, Boyle JP, Collier S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, Ajioka JW, Boothroyd JC. 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314:1780-1783.
- Saeij JP, Collier S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC. 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445:324-327.

- Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J.Immunol.* 168:5997-6001.
- Scharton-Kersten TM, Wynn TA, Denkers EY, Bala S, Grunvald E, Hieny S, Gazzinelli RT, Sher A. 1996. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J.Immunol.* 157:4045-4054.
- Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J.Exp.Med.* 185:1261-1273.
- Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA. 1994. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:509-513.
- Sibley LD. 2003. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic.* 4:581-586.
- Sibley LD. 2004. Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 304:248-253.
- Sibley LD, Andrews NW. 2000. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic.* 1:100-106.
- Sibley LD, Boothroyd JC. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359:82-85.
- Sibley LD, Krahenbuhl JL, Adams GM, Weidner E. 1986. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J.Cell Biol.* 103:867-874.
- Sibley LD, Mordue D, Howe DK. 1999. Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. *Immunobiology* 201:210-224.
- Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK. 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 357:81-88.
- Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, Cesbron-Delauw MF. 1995. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J.Cell Sci.* 108 (Pt 4):1669-1677.
- Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL. 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315:416-419.
- Sinai AP, Joiner KA. 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J.Cell Biol.* 154:95-108.
- Sinai AP, Webster P, Joiner KA. 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J.Cell Sci.* 110 (Pt 17):2117-2128.
- Striepen,B. and Soldati,D. (2007). Genetic Manipulation of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods*, Academic Press), pp. 391-415.
- Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD. 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299:414-416.

- Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD. 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:10753-10758.
- Suss-Toby E, Zimmerberg J, Ward GE. 1996. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:8413-8418.
- Suzue K, Asai T, Takeuchi T, Koyasu S. 2003. In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur.J.Immunol.* 33:2666-2675.
- Suzuki Y. 2002. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J.Infect.Dis.* 186 Suppl 2:S234-S240.
- Taylor GA, Collazo CM, Yap GS, Nguyen K, Gregorio TA, Taylor LS, Eagleson B, Secret L, Southon EA, Reid SW, Tessarollo L, Bray M, McVicar DW, Komschlies KL, Young HA, Biron CA, Sher A, Vande Woude GF. 2000. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:751-755.
- Taylor GA, Feng CG, Sher A. 2004. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat.Rev.Immunol.* 4:100-109.
- Taylor GA, Feng CG, Sher A. 2007. Control of IFN-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related GTPases (p47 GTPases). *Microbes.Infect.* 9:1644-1651.
- Taylor GA, Stauber R, Rulong S, Hudson E, Pei V, Pavlakis GN, Resau JH, Vande Woude GF. 1997. The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. *J.Biol.Chem.* 272:10639-10645.
- Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, Beatty WL, Hajj HE, Jerome M, Behnke MS, White M, Wootton JC, Sibley LD. 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314:1776-1780.
- Tomley FM, Soldati DS. 2001. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* 17:81-88.
- Tsuji M, Miyahira Y, Nussenzweig RS, Aguet M, Reichel M, Zavala F. 1995. Development of antimalaria immunity in mice lacking IFN-gamma receptor. *J.Immunol.* 154:5338-5344.
- Uthaiyah RC, Praefcke GJ, Howard JC, Herrmann C. 2003. IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. *J.Biol.Chem.* 278:29336-29343.
- Weiss LM, Kim K. 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 5:D391-D405.
- WINSSER J, VERLINDE JD, . 1948. Isolation of toxoplasma from cerebrospinal fluid of a living infant in Holland. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 67:292-294.
- Yap G, Pesin M, Sher A. 2000. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.* 165:628-631.

- Yap GS, Sher A. 1999. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 201:240-247.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626-1629.
- Zerrahn J, Schaible UE, Brinkmann V, Guhlich U, Kaufmann SH. 2002. The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum-associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J.Immunol.* 168:3428-3436.
- Zhao Y, Ferguson DJ, Wilson DC, Howard JC, Sibley LD, Yap GS. 2009. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. *J.Immunol.* 182:3775-3781.
- Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, Dalpke AH. 2006. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J.Immunol.* 176:1840-1847.
- Zinkernagel, R.M. (2005). Grundlagen der Immunologie. In *Medizinische Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, pp. 75-158.

VIII Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
A	Adenin
A ₂₆₀	Absorption bei 260
A ₂₈₀	Absorption bei 280
Abb.	Abbildung
AIDS	“acquired immunodeficiency syndrom”
Ak	Antikörper
AMA	Mikronemales-Protein
Amp	Ampicillin
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriposphat
A-Überhang	Adenin-Überhang
Bp	Basenpaare
Bq	Bequarel
BSA	bovines Serumalbumin; Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca.	Circa
CAT	Chloramphenicol
CCR	“cystein cystein chemokin receptor”
CD	“cluster of differentiotion”
Cpm	“counts per minute”
cy2	Carbocyanin
Cyt D	Cytochalsin
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5`-triphosphat
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol- Dihydrochloridhydrat
dCTP	Desoxycytidine 5`-triphosphate
dGTP	Desoxyguanosine 5`-triphosphate
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	“desoxyribonucleic acid”; Desoxribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
dTTP	Deoxythymidine 5'-triphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme linked immunosorbent assay”
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum; Fötales Kälberserum
FITC	“fluorescein isothiocyanate”
g	Gramm
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GFP	green fluorescent protein
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GRA	„dense granule protein“
GTP	Guanosintetraphosphat
h	Stunde(n)
HIV	„human immunodeficiency virus“
HZK	Hirnzellkultur
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRG	“immunity-related GTPases”
kb	Kilo-Base
kDa	Kilo-Dalton
kV	Kilo-Volt
LB	lysogeny broth
LB-AMP	lysogeny broth mit Ampicillin
LD	lethale Dosis
log	Logarithmus
m	Milli (10^{-3})

M	Molar
mA	Milliampere
MACS	magnetic cell sorting
MBq	Mega-Becquerel
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
MIC	Mikronemen
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MJ	“moving junction”
μ	Mikro (10^{-6})
μ F	Mikrofarad
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	„nuclear localization signal“, Kernlokalisierungssignal
NO	“nitric oxide”; Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	“phosphate buffered saline”
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDNA	Plasmid DNA
PI	Propidiumjodid
PP2C	Klasse 2 c Protein-Phosphatase
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuolen-Membran
QTL	quantitativer trait locus
ROS	„ reactive oxygen spezies“ reaktive Sauerstoffintermediate
RON	Rhoprien-Organellen Hals
ROP	Rhoprien-Organellen Körper
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAG	„surface antigen“
S1	Sicherheitsstufe 1
SD	Standardabweichung

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
STAT	“signal transducer and activator of transcription”
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TLR	“toll-like receptor”
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	“volume per volume“
w/v	“weight per volume“
YFP	“yellow fluorescent protein”
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Klaus Pfeffer, der mir wissenschaftliches Arbeiten in einem sehr anregenden und fördernden Umfeld ermöglichte und mich gerade in der Endphase mit intensiver Betreuung unterstützte und so zum Gelingen und Vollenden dieser Arbeit ganz erheblich beitrug.

Ein großes Dankeschön geht an meine Arbeitsgruppe, vor allem aber an Dr. Gaby Reichmann, die mir insbesondere zu Beginn meiner Arbeit immer zur Seite stand und mich für die Forschung und Wissenschaft begeisterte.

Des Weiteren möchte ich Anne Mausberg ein riesiges Dankeschön aussprechen, ohne Ihre Hilfe wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Großen Dank an Daniel Degrandi und Max von Holleben für die Betreuung sowie Anregungen in Bezug auf das Gelingen meiner Arbeit.

Vielen Dank an Katrin Spekker, die mir eine große Hilfe bei der Transfektion von Toxoplasmen war.

Weiter möchte ich mich herzlichst bei allen Mitgliedern des Schreibraums bedanken die stets zu einer angenehmen und heiteren Stimmung beigetragen haben.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Daniela Hofen bedanken, die nie müde war diese Arbeit zu korrigieren.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die mich stets unterstützt und motiviert hat und mir in allen Lebenslagen zur Seite stand.

3 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und dass die Doktorarbeit an keiner anderen Fakultät vorgelegt wurde.

Düsseldorf, 2010

4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Felix Philip Lubitz
Geburtsdatum: 13. Juni 1981
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Bildungsgang:

1987-1993 Grundschule in Berlin Steglitz und Stuttgart Vaihingen
1994-1997 Gymnasium: Königin-Luise-Stiftung Berlin Dahlem
1997-1997 High School: University City High School San Diego CA, USA
1999-2000 Abitur : Königin-Luise-Stiftung Berlin
2000-2001 Zivildienst: Lungenklinik Heckeshorn, Berlin Wannsee
2001-2002 Rettungssanitäterausbildung, DRK
2002-2003 College International Budapest
2003-2005 Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität Budapest
ärztliche Vorprüfung
2005-2010 Klinischer Teil des Studiums an der Heinrich Heine Universität
Düsseldorf
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 05/ 2010
2006-2010 medizinische Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Krankenhaushygiene, Universität Düsseldorf
seit 2010 Assistenzarzt in Weiterbildung am Herzzentrum Duisburg