

**Biochemische und funktionelle Charakterisierung eines neuen  
„dense granules“ Proteins von *Toxoplasma gondii*:**

**GRA9**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Koku Zikpi Adjogblé

aus Togo

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. W. Däubener

Koreferent: Prof. Dr. J. F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von Dezember 2000 bis Dezember 2003.

## Bisherige Veröffentlichungen

K.D.Z. Adjogble , C. Mercier , C. McKenzie, M-F. Cesbron-Delauw and W. Däubener  
*GRA9, a new Toxoplasma dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes*

Zur Veröffentlichung bei *International Journal of Parasitology* eingereicht.

K.D.Z. Adjogble , C. Mercier , C. McKenzie, M-F. Cesbron-Delauw and W. Däubener  
*New insights on the Toxoplasma antigen formerly reported as B10: a new dense granule protein, GRA9. Seventh International Congress on Toxoplasmosis, 23-27 Mai 2003, Tarrytown, New York. (Vortrag)*

K.D.Z. Adjogble , C. Mercier , C. McKenzie, M-F. Cesbron-Delauw and W. Däubener  
*GRA9, a new Toxoplasma dense granule protein secreted into the lumen of the parasitophorous vacuole. Seventh International Congress on Toxoplasmosis, 23-27 Mai 2003, Tarrytown, New York. (Poster)*

Adjogble, K.Z. , Mercier C., McKenzie C., Cesbron-Delauw M-F. and W. Däubener  
*Toxoplasma gondii dense granules protein GRA9. Accession AY371455. EMBL,2003.*

Christian Hucke, Colin R. MacKenzie, Koku D.Z. Adjogble, Osamu and Walter Däubener  
*Nitric oxide-mediated regulation of IFN $\gamma$ -induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase*  
Akzeptiert zur Veröffentlichung bei *Infection and Immunity (IAI)*.

## Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Biologie von <i>Toxoplasma gondii</i> und Krankheitsbilder	1
I.1.1 Taxonomie und Bedeutung von <i>Toxoplasma gondii</i>	1
I.1.2 Der Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i>	1
I.1.3 Toxoplasmose	3
I.1.4 Diagnose und Therapie der Toxoplasmose	3
I.2 Motilität und intrazelluläres Leben von <i>T. gondii</i>	4
I.2.1 Der Apikalkomplex	4
I.2.2 Die charakteristischen sekretorischen Organellen von <i>T. gondii</i>	5
I.2.2.1 Die Mikronemen	6
I.2.2.2 Die Rhoptrien	6
I.2.2.3 Die Dichten Granula	6
A. GRA-Proteine und ihre Zielorte	7
B. Sekretion von GRA-Proteinen und Entstehung des intravakuolären Netzwerks	8
C. Funktion der GRA-Proteine von <i>T. gondii</i>	8
I.2.3 Gezielter Transport von Mic-, Rop- und Gra-Proteinen zu den sekretorischen Organellen	9
I.2.5 Fortbewegung von <i>T. gondii</i>	11
I.2.6 Invasion von Wirtszellen durch <i>T. gondii</i> und die Entstehung der parasitophoren Vakuole	12
I.2.7 Asexuelle Vermehrung und Egression aus der parasitophoren Vakuole	14
I.3 Genetik von <i>T. gondii</i>	15
I.3.1 Das Genom von <i>Toxoplasma gondii</i>	15
I.3.2 Gen-Expression in <i>T. gondii</i>	16
I.4 <i>T. gondii</i> im Labor	17
I.5 Zielsetzung	18
II. Material und Methoden	19
II.1. Material	19
II.1.1 Allgemeines	19
II.1.2 Plasmide	19
II.1.3 Proteine	19
II.1.3.1 Antikörper	19
II.1.3.2 Restriktionsenzyme	20
II.1.3.2 Sonstige Enzyme	20
II.1.4 Nukleinsäuren, Desoxyoligonukleotide und Nukleotide	20
II.1.5 Medien und Puffer	21
II.1.6 Feinchemikalien	22
II.1.7 Sonstige Materialien und Geräte	24
II.1.8 Organismen	25
II.1.8.1 Mausstämme	25
II.1.8.2 Zelllinien	25
II.1.8.3 <i>Toxoplasma gondii</i> Stämme	25
II.1.8.4 Bakterien	25
II.2 Methoden	25

II.2.1 Zellkulturmethoden	25
II.2.2 Kultivierung und Einfrieren von Zelllinien	26
II.2.2.1 L929 Fibroblasten	26
II.2.2.2 HFF Fibroblasten (human foreskin fibroblast)	26
II.2.2.3 Toxoplasmen	26
II.2.2.3.1 <i>In vitro</i> Kultivierung und Konservierung	26
II.3 Gewinnung von Hirnzysten	27
II.4 Mikrobiologische Methoden	27
II.4.1 Haltung von Bakterienstämmen	27
II.4.2 Anzucht von Übernacht-Kulturen (ü.N.-Kulturen)	28
II.4.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	28
II.4.4 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	28
II.5 Molekularbiologische Methoden	29
II.5.1 UV/VIS-Spektroskopie	29
II.5.1.1 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	29
II.5.1.2 Streumessung	29
II.5.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	29
II.5.1.4 Aufreinigung von DNA	30
II.5.1.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	30
II.5.1.4.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren	30
II.5.2 Enzymatische Reaktionen	30
II.5.2.1 Restriktionshydrolysen	30
II.5.2.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	31
II.5.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten	31
II.5.2.4 cDNA-Synthese	31
II.5.2.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	31
II.5.2.6 DNA-Sequenzierungen	32
II.5.3 Isolierung von Nukleinsäuren	32
II.5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA	32
II.5.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
II.5.3.3 Isolierung von genomischer DNA	33
II.5.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA	33
II.5.3.5 Isolation genomischer <i>GRA9</i> Sequenzen von <i>T. gondii</i> 'Genome walking'	34
II.6 Gelelektrophoresen	35
II.6.1 Agarosegelelektrophorese	35
II.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	36
II.7 Proteinanalysen	37
II.7.1 <i>In vitro</i> Induktion von „excreted-secreted-antigens“ (ESA)	37
II.7.2 Aufbrechen von Zellen durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen	38
II.7.3 Aufschließen von Zellen durch Ultraschall	38
II.7.4 Zellfraktionierung extrazellulärer Toxoplasmen und Triton X-114 Partitionierung	38
II.7.5 Zellfraktionierung intrazellulärer Toxoplasmen und Behandlung von membranassoziierten Proteinen	39
II.7.6 Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein G	39
II.7.6.1 Metabolische Markierung von <i>T. gondii</i> mit radioaktivem [ <sup>32</sup> P]-orthophosphat	40
II.7.6.2 Glykoprotein-Detektion	41
II.7.6.3 Protein-Protein-Interaktionsuntersuchung	41

II.7.6 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen	42
II.7.6.1 Coomassie-Färbung von Proteinen	42
II.7.6.2 Elektrotransfer von Proteinen und Western Blot	42
II.7.6.4 ‚Enzyme linked immunosorbent assay‘ (ELISA)	43
II.8 Untersuchungen mittels Mikroskop	44
II.8.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	44
II.8.2 Kryo-Elektronenmikroskopische Detektion	45
II.9 Erzeugung von <i>Toxoplasma gondii</i> Mutanten	45
II.9.1 Überexpression von Proteinen in <i>T. gondii</i>	45
II.9.2 Zielvektor zur Generierung von <i>GRA9</i> ‚Knock-out‘ Mutanten: p5’G9ble3’G9	46
II.9.3 Transfektion von <i>Toxoplasma gondii</i>	46
II.9.4 Isolierung stabiler <i>T. gondii</i> -Transfektanten	47
II.10 Sequenzanalyse	47
III. Ergebnisse	48
III.1 Herstellung eines Antiserums gegen das Toxoplasmenantigen B10	48
III.2 Lokalisierung des B10 Proteins in <i>T. gondii</i>	50
III.2.1 Lokalisierung des B10 Proteins in mit Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen	50
III.2.2 Definition des B10 Proteins als ein neues GRA-Protein: GRA9	52
III.2.3 Sekretion von GRA9: Analyse mittels Immunfluoreszenz	53
III.2.3.1 Sekretionskinetik von GRA9 nach der Invasion der Wirtszelle durch <i>T. gondii</i>	53
III.2.3.2 Im Lumen der PV ist GRA9 mit dem tubulären Netzwerk assoziiert	55
III.2.3.3 Die Innenseite der PVM wird von GRA9 dekoriert	57
III.3. Biochemische Charakterisierung von GRA9	59
III.3.1 Protein-Sequenz-Analyse von GRA9	59
III.3.2 Analyse posttranslationaler Modifizierungen des nativen GRA9-Proteins	60
A. Glykosylierung	61
B. Phosphorylierung	62
III.3.3 GRA9 in „dense granules“	63
III.3.4 Bindung von GRA9 an das Netzwerk in der parasitophoren Vakuole	66
III.3.5 Protein-Protein-Interaktionen	68
III.4 Stadienspezifische Expression von GRA9	70
III.5 Funktionelle Charakterisierung von GRA9 mittels „Knock-out“ Mutante	71
III.5.1 Isolierung der flankierenden DNA-Sequenzen des GRA9-Lokus durch „Genome Walking“	71
III.5.2 Charakterisierung der Promotorenregion des GRA9 Gens	72
III.5.3 Konstruktion des Zielvektors und Herstellung von GRA9-„Knock-out“-Mutanten	73
III.5.4 Phänotypische Charakterisierung der GRA9-defizienten Toxoplasmen	76
III.6 Überexpression von GRA9 in Toxoplasmen	77
III.6.1 Konstruktion des Expressionsvektors pGRA9-myc	77
III.6.1 Transiente Expression von GRA9-myc und LDH1-myc in Toxoplasmen	77
IV. Diskussion	80
IV.1 Das <i>T. gondii</i> B10 Protein gehört zu den „dense granules“ Proteinen und erhält die systematische Bezeichnung GRA9	80

---

IV.2 GRA9 kommt in DGs in zwei Formen vor: Eine freie und eine membrangebundene Form	82
IV.3 Die Sekretion von GRA9 erfolgt am apikalen Pol des Parasiten und ist wahrscheinlich nicht an der Bildung des Netzwerks in der PV beteiligt	84
IV.4 In der PV ist GRA9 mit dem Netzwerk assoziiert	85
IV.5 Analyse der Interaktion von GRA9 mit dem Netzwerk	86
IV.6 GRA9 wird in Bradyzoiten exprimiert	88
IV.7 Funktionelle Charakterisierung von GRA9	88
V. Zusammenfassung	94
VI. Referenzen	96
VII. Abkürzungsverzeichnis	108
VIII. Danksagung	111

## I. Einleitung

### I.1 Biologie von *Toxoplasma gondii* und Krankheitsbilder

#### I.1.1 Taxonomie und Bedeutung von *Toxoplasma gondii*

Der obligat intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), der Erreger der Toxoplasmose, wurde erstmals 1908 von Nicolle und Manceaux beschrieben (Nicolle und Manceaux, 1908). Die Speziesbezeichnung leitet sich von dem nordafrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gondi* ab, aus dem der Parasit isoliert wurde.

Der Name *Toxoplasma* findet seine Abstammung in der griechischen Bezeichnung für Bogen, *toxon*, was sich auf die gekrümmte Form des Parasiten bezieht. *Toxoplasma gondii* gehört zu den Einzellern (Protozoa) des Stammes Apicomplexa, der etwa 5000 Arten umfasst und in die Ordnung der Coccidien klassifiziert wird (Levine, 1987).

Der Begriff „Apicomplexa“ wird von dem charakteristisch strukturierten Apikalkomplex abgeleitet. Zum Stamm der Apicomplexa gehören neben *T. gondii* weitere humanpathogene Spezies, z.B. Plasmodien spec. (Malaria), Coccidien, *Eimeria* spec. und Cryptosporidien spec..

Nahezu alle kernhaltigen Säuger- und Vogelzellen können mit Toxoplasmen infiziert werden (Wong & Remington, 1993; Dubey, 1998). Katzen bzw. Katzenartige (*Felidae*) sind dabei die Endwirte von Toxoplasmen (Wallace, 1972). Die Infektion des Menschen erfolgt durch den Verzehr von zystenhaltigem, rohem Fleisch oder durch Kontakt mit Katzenkot, der Oozysten enthält. Oozysten können unter optimalen Bedingungen mehrere Jahre lang infektiös bleiben. 10-25% der gesamten Weltbevölkerung sind mit *T. gondii* infiziert (Sibley & Howe, 1996), wobei die Infektionswahrscheinlichkeit maßgeblich vom Alter, dem Wohnort und den Ernährungsgewohnheiten abhängt.

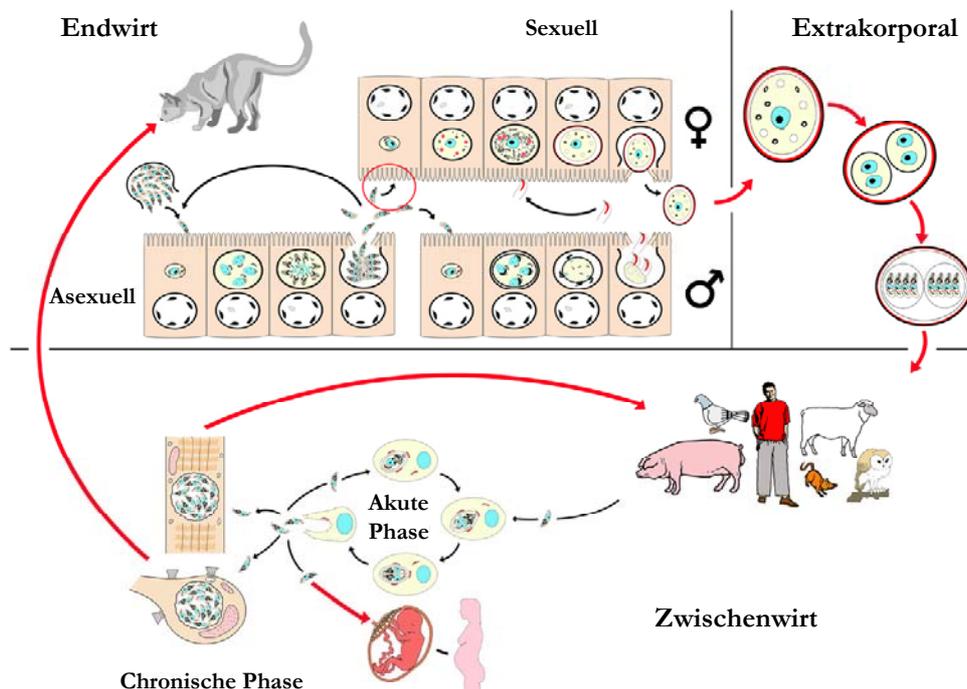
#### I.1.2 Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Im Lebenszyklus von *Toxoplasma* sind zwei Phasen zu unterscheiden: ein feliner Teil, der in der Katze, dem Endwirt, stattfindet, und ein nichtfeliner Teil in diversen Zwischenwirten. Diese Unterteilung spiegelt die Phasen der sexuellen und asexuellen Fortpflanzung wieder (Abbildung1).

In der Phase der asexuellen Vermehrung werden zwei Formen des Parasiten beobachtet, die sich u.a. in ihrer Generationszeit unterscheiden: eine schnell replizierende Form, die sogenannten Tachyzoiten (griech. tachys = schnell), welche in der akuten Phase der Infektion auftreten und eine Größe von ca. 5µm haben. Im infizierten Organismen können die

Tachyzoiten sich in die langsam wachsende Form der Bradyzoiten (griech. brady = langsam) differenzieren. Bradyzoiten befinden sich innerhalb von Zysten, die eine Größe von ca. 150µm haben und erstmals ca. 7 bis 10 Tage nach der Infektion nachweisbar sind. Diese Zysten werden hauptsächlich in der Muskulatur und im zentralen Nervensystem gebildet, wo sie lebenslang verbleiben. Dies stellt die chronische Phase des asexuellen Zyklus dar. Innerhalb des Wirtes können sporadische Reaktivierungen der Bradyzoiten stattfinden, die sich wieder zu Tachyzoiten differenzieren. Diese Reaktivierung ist bei immunkompetenten Wirten in der Regel klinisch unauffällig, nur bei immunsupprimierten Patienten entsteht eine klinisch manifeste Toxoplasmose.

Die Bradyzoiten in den Gewebszysten dienen auch als Erregerreservoir bei der Infektion von Fleischfressern, denn nach dem Aufbruch der Zysten, z.B. bei einer Aufnahme durch Verzehr, werden die Bradyzoiten freigesetzt und infizieren das Darmepithel, wo sie sich zu Tachyzoiten differenzieren, die sich im ganzen Körper ausbreiten. Die Ausbreitung im Körper erfolgt z.T. durch die Infektion bestimmter Makrophagen-Subpopulationen. Dies schließt den asexuellen Zyklus ab.



**Abb.1: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *T. gondii*.**

Der sexuelle Vermehrungszyklus findet nur in Feliden statt. Die sexuelle und asexuelle Komponente dieser Zyklen sind voneinander unabhängig, d.h. es kann auch nur der asexuelle Zyklus (unendlich oft) stattfinden. Auch in der Katze kann der asexuelle Zyklus ablaufen (Coppin *et al.*, 2003).

Nimmt eine Katze infiziertes Fleisch (z.B. eine Maus) auf, kann im Darm der Katze der Lebenszyklus der Toxoplasmen mit der Bildung der sexuellen Stadien beendet werden. Die sogenannte Gamogonie geschieht in den Enterozyten des Darms. Es kommt zur Bildung von Mikro- und Makrogameten, die miteinander fusionieren und sich zu Oozysten entwickeln. Die Oozysten werden mit dem Kot ausgeschieden und im Freien entstehen in ihnen durch Sporulation 8 Sporoziten, die dann von anderen Lebewesen aufgenommen werden und in diesen die oben beschriebenen asexuellen Vermehrungsformen bilden.

### **I.1.3 Toxoplasmose**

In immunkompetenten Wirten verläuft die Infektion mit Toxoplasmen oft symptomlos oder subklinisch ähnlich einem leichten grippalen Infekt mit schmerzloser Lymphadenopathie, Müdigkeit und gelegentlichem Fieber. Dieses Krankheitsgefühl kann mehrere Wochen dauern, eine medikamentöse Behandlung ist jedoch nicht erforderlich. Die akute Phase wird mit der Bildung der Parasitenzysten im Gewebe (Muskulatur und Gehirn) beendet und die Infektion geht in die chronische Phase, die klinisch stumm verläuft, über.

Bei AIDS-Patienten, Organtransplantat-Empfängern oder anderen immunsupprimierten Personen kann es zu einer Reaktivierung der chronischen Infektion kommen, in deren Verlauf häufig eine Toxoplasmen-Enzephalitis oder –Pneumonie auftreten (Wong & Remington, 1993), die unbehandelt meistens zum Tod führen (Luft & Remington, 1992).

Bei einer Erstinfektion von Schwangeren führen 25% der mütterlichen Infektionen, die im ersten Trimester der Schwangerschaft erworben wurden, zu einer kongenitalen Infektion (Desmots & Couvreur, 1974). Allgemein gilt, je früher während der Schwangerschaft die Erstinfektion mit dem Parasiten auftritt, desto seltener passiert der Parasit die Plazentaschranke, aber desto gravierender sind die Folgen einer Infektion des Kindes (Desmots & Couvreur, 1974). Die Infektionsfolgen können sich unterschiedlich manifestieren, beschrieben sind: Totgeburten, Aborte, Hydrocephalus, Retinochorioriditis aber auch völlige Symptomlosigkeit. Teilweise fallen die durch die intrauterine Infektion gesetzten Schäden erst Jahre später auf (Sever *et al.*, 1988).

### **I.1.4 Diagnose und Therapie der Toxoplasmose**

Der Nachweis der Toxoplasmose erfolgt in erster Linie serologisch mit verschiedenen Methoden zur Bestimmung von *Toxoplasma*-spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern. IgM-Antikörper können bereits eine Woche nach der Infektion nachgewiesen werden. Ihre Konzentration erreicht nach ca. vier Wochen ein Maximum und sinkt dann meist innerhalb

von ca. zwei Monaten bis unter die Nachweisgrenze ab. IgG-Antikörper werden erst später nachgewiesen und erreichen nach ca. vier Monaten die höchste Konzentration. Nachweisbar bleiben die IgG-Antikörper aber über Jahre hinweg. Eine akute Infektion zeichnet sich daher durch einen ansteigenden IgG-Titer und das Vorhandensein von IgM-Antikörpern aus (Kayser *et al.*, 1993). Problematisch wird die serologische Diagnostik jedoch durch die Tatsache, dass die IgM-Antikörper bei vielen Patienten oft jahrelang nachweisbar bleiben und damit eine Differentialdiagnose zwischen akuter und chronischer Infektion schwierig ist.

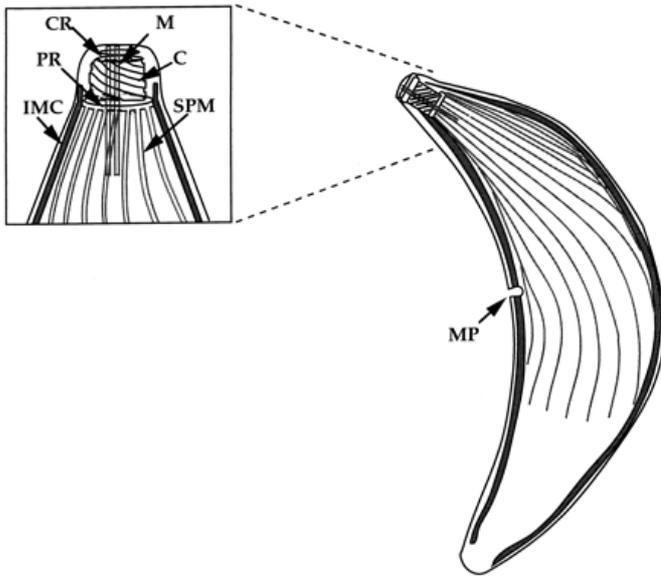
Die derzeitige Behandlung der Toxoplasmose besteht aus Sulfonamid und Pyrimethamin (Tenant-Flowers *et al.*, 1991) und wirkt effektiv gegen die schnell replizierenden Parasiten des akuten Stadiums, die sogenannten Tachyzoiten. Auch die Gabe von Clindamycin ist möglich. Diese Behandlung führt nicht zu einer Elimination des Parasiten denn sie wirkt nicht auf die Parasiten der chronischen Phase, die sogenannten Bradyzoiten. Die chronische Infektion kann durch die medikamentöse Therapie nicht verhindert werden, und bei immunsupprimierten Personen mit einer chronischen Toxoplasmose ist eine dauerhafte Medikamenteneinnahme erforderlich.

## **I.2 Motilität und intrazelluläres Leben von *T. gondii***

### **I.2.1 Der Apikalkomplex**

Der Apikalkomplex ist am Vorderende des Parasiten lokalisiert und besteht aus mehreren Komponenten: dem Conoid, dem Polringkomplex, den sekretorischen Organellen und den subpelliculären Mikrotubuli (Dubey *et al.*, 1998). Allgemein dient der Apikalkomplex als Penetrationsapparat beim Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle. In räumlicher Nähe zum Apikalkomplex befindet sich auch der Apicoplast, dessen Funktion in einem späteren Kapitel erklärt wird.

Wie die Abbildung 2 zeigt, besteht das konusförmige Conoid aus schraubig verlaufenden Mikrotubuli und ist mit den präconoidalen Ringen und dem Polringkomplex verbunden (Morrissette *et al.*, 1994). Ferner besitzt *Toxoplasma* 22 subpelliculäre Mikrotubuli, die dem Parasiten die gebogene Form verleihen und für die apikale Polarität verantwortlich sind. Diese 22 Mikrotubuli sind am Polringkomplex, dem sogenannten „microtubuli organization center“ miteinander verbunden (Nichols & Chiappino, 1987). Die sekretorischen Organellen des Apikalkomplexes sind die Mikronemen und die Rhoptrien (Carruthers & Sibley, 1997); (Black & Boothroyd, 2000).

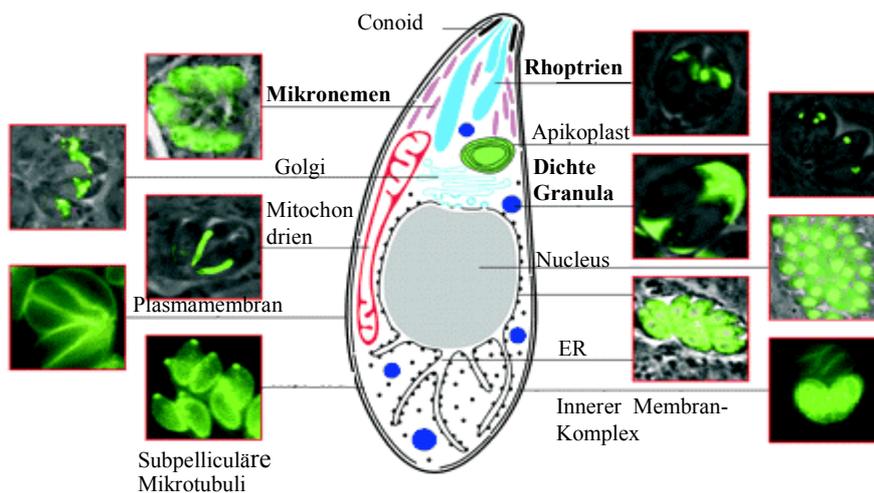


**Abb.2 : Das *T. gondii* Zytoskelett:**

Das Diagramm stellt den Aufbau des Zytoskelettes von *Toxoplasma gondii* dar. Preconoidaler Ring (CR); Conoid (C); Mikrotubuli (M); Polarring (PR); Subpelliculäre Mikrotubuli (SPM); Innerer Membran-Komplex (IMC); Mikropore (MP) (Black & Boothroyd, 2000).

**I.2.2 Die charakteristischen sekretorischen Organellen von *T. gondii***

Mikronemen, Rhoptrien und Dichte Granula sind die typischen sekretorischen Organellen der Apicomplexa (Carruthers & Sibley, 1997). Sie sind an der Invasion der Wirtszelle und dem „Einrichten“ des Parasiten innerhalb der Wirtszelle beteiligt. Die Organellen unterscheiden sich in ihrer Form, Lokalisation innerhalb der Wirtszelle und in der Zusammensetzung ihrer Proteine.



**Abb. 3: Darstellung der subzellulären Organellen von *T. gondii*.**

Verschiedene Proteine von *Toxoplasma gondii* wurden mit GFP (green fluorescent protein) bzw. YFP (yellow fluorescent protein) markiert. Dadurch konnten verschiedene Organellen des Parasiten *in vivo* gezielt dargestellt werden (Striepen *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 2000; Striepen *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2001; Radke *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2002; Swedlow *et al.*, 2002).

### **I.2.2.1 Die Mikronemen**

Die Mikronemen sind kleine zigarrenförmige Organellen, die am apikalen Pol des Parasiten lokalisiert sind. In *T. gondii* sind 12 Mikronemen-Proteine (MIC-Proteine) bekannt: MIC1-10, TgAMA-1 und TgM2AP. Die Mikronemenproteine sind sowohl für die Bindung des Parasiten an die Wirtszelle von Bedeutung, als auch für das substratabhängige Gleiten über Oberflächen (Sibley *et al.*, 1998). Die Anzahl der Mikronemen ist nicht für alle Apicomplexa gleich. *T. gondii* Tachyzoiten besitzen relativ wenige Mikronemen, da sie nur über kurze Strecken gleiten, während *Eimeria*-Sporozoitien viele Mikronemen besitzen und auch schnell und weit über Oberflächen gleiten können (Bumstead & Tomley, 2000).

In *Sarcocystis muris* (Entzeroth *et al.*, 1992), *Eimeria tenella* (Tomley *et al.*, 1996) und *T. gondii* (Wan *et al.*, 1997) wurde gezeigt, dass die Sekretion der Mikronemen-Proteine direkt nach der Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle erfolgt. Die Sekretion wird durch die Mobilisierung des  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol des Parasiten induziert (Carruthers, 1999). Dies ist pharmakologisch beeinflussbar: Ethanol oder Ionophore können in Toxoplasmen durch die Mobilisierung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  die Sekretion von Mikronemenproteinen induzieren (Carruthers *et al.*, 1999), wogegen die Chelation von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  deren Sekretion inhibiert (Carruthers & Sibley, 1999).

### **I.2.2.2 Die Rhoptrien**

Rhoptrien sind langgestreckte, kegelförmige Organellen, die über einen dünnen Kanal mit dem apikalen Ende des Parasiten verbunden sind. Sie entlassen ihren Inhalt (ROP-Proteine) während der Invasion durch diesen Kanal in die parasitophore Vakuole (PV). Die Sekretion geschieht sofort nach der Mikronemen-Sekretion, ist  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig (Carruthers & Sibley, 1997) und mit dem Ende der Invasion abgeschlossen. Zur Zeit sind 7 Rhoptrien-Proteine (ROP1-7) von *T. gondii* beschrieben. Die Sekretion von ROP1 ist eng mit der beginnenden Bildung der PV verbunden (Carruthers & Sibley, 1997). Die restlichen ROP-Proteine haben wahrscheinlich ebenfalls Aufgaben bei der Bildung der PV, da sie sofort nach der Invasion mit der Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) assoziiert zu sein scheinen (Saffer *et al.*, 1992).

### **I.2.2.3 Die Dichten Granula**

Die runden elektronendichten Granula, die sogenannte „dense granules“ (DG) sind gleichmäßig über den Parasiten verteilt und entlassen ihren Inhalt nach der Invasion in die PV (Dubremetz *et al.*, 1993). Die Dichten Granula enthalten verschiedenen Proteine (GRA-

Proteine), von denen zur Zeit 11 bekannt sind: GRA1-8 (Carey *et al.*, 2000), 2 Isoformen der 5'-Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPase) und Cyclophilin 18 (Karsten *et al.*, 1998).

### A. GRA-Proteine und ihre Zielorte

Die „dense granules“ enthalten wie beschrieben verschiedene Proteine, die nach der Sekretion zu verschiedenen Stellen in der parasitophoren Vakuole transportiert werden. Man findet die Proteine z.T. löslich und z.T. membrangebunden innerhalb der parasitophoren Vakuole (Charif *et al.*, 1990; Achbarou *et al.*, 1991):

- **GRA1** ist ein lösliches Protein, welches mit dem Netzwerk in Lumen der PV assoziiert ist. Die Aminosäuresequenz von GRA1 enthält mehrere charakteristische Domänen für Kalzium-abhängige Interaktionen (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989).
- **GRA2** kommt in zwei Formen in der PV vor, eine lösliche und eine membran-assoziierte Form. Die Aminosäuresequenz von GRA2 zeigt keine Transmembrandomäne aber beinhaltet eine große amphiphile Alpha-Helix-Region, die eine Bindung an Membranen vermitteln kann (Sibley *et al.*, 1995; Mercier *et al.*, 1993). Bis jetzt bleibt GRA2 das einzige beschriebene GRA-Protein dessen genomische DNA-Sequenz ein Intron (241 Basenpaare) enthält (Mercier *et al.*, 1993).
- **GRA3** interagiert mit der PVM und mit den membranösen Netzwerkstrukturen innerhalb der PV. Die Aminosäuresequenz von GRA3 enthält zwar keine typische Transmembrandomäne, aber mehrere kurze hydrophobe Bereiche (Bermudes *et al.*, 1994; Ossorio *et al.*, 1994), die eine Interaktion mit Membranen ermöglichen.
- **GRA4** und **GRA6** assoziieren mit dem intravakuolären Netzwerk. Die Aminosäuresequenz der beiden GRA-Proteine weist jeweils eine klassische Transmembrandomäne auf (Achbarou *et al.*, 1991; Lecordier *et al.*, 1995).
- **GRA5** ist ausschließlich mit der PVM assoziiert. Die Assoziation von GRA5 mit der PVM wird durch hydrophobe Molekülregionen vermittelt (Lecordier *et al.*, 1999).
- **GRA7** wird durch die in seiner Aminosäuresequenz enthaltene hydrophobe Region in die PVM inseriert. Es handelt sich um ein integrales Membranprotein, das auch außerhalb der PVM durch Immunfluoreszenz detektierbar ist (Fischer *et al.*, 1998),
- **GRA8** ist ein Prolin-reiches Protein, welches eine Assoziation mit der PVM aufweist. Außer der zentralen Prolinreichen-Region, ist eine zusätzliche potentielle Transmembrandomäne am C-Terminus beschrieben (Carey *et al.*, 2000), die ebenfalls zur Interaktion mit der PVM beitragen könnte.

## **B. Sekretion von GRA-Proteinen und Entstehung des intravakuolären Netzwerks**

Die Sekretion von GRA-Proteinen erfolgt nicht ungezielt, sondern weist eine Reihe von Merkmalen einer „regulierten Exozytose“ auf, z.B.. die Verpackung der GRA Proteine in elektronendichte Vesikel, die Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran und die Induktion der Sekretion durch äußere Signale.

Die DG Exozytose bei *T. gondii* erfolgt über zwei verschiedene, unabhängige Mechanismen:

1. die Fusion der oben beschriebenen elektronendichten Vesikel mit der Plasmamembran des apikalen, anterioren Pols und die Freisetzung eines amorphen Materials in die PV (Lerliche & Dubremetz, 1990), das z.B. GRA1 beinhaltet.
2. die Freisetzung von membranösen Strukturen am posterioren Pol des Parasiten (Sibley *et al.*, 1995). Mittels Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass diese membranöse Strukturen GRA2 beinhalten (Sibley *et al.*, 1995).

Man kann davon ausgehen, dass die Sekretion am posterioren Pol insbesondere für die Ausbildung und Entstehung des Netzwerkes in der parasitophoren Vakuole von Bedeutung ist. Dies ergibt sich aus Immunlokalisationsstudien mit Antikörpern gegen GRA4 und GRA6. Beide werden ähnlich wie GRA2 am posterioren Pol freigesetzt und sind danach in Assoziation mit dem intravakuolären Netzwerk nachweisbar.

Die GRA-Proteine GRA2, GRA4 und GRA6 bilden, durch hydrophobe Stabilisierung (GRA2 und GRA6) und durch Protein-Protein-Interaktion (GRA4), einen trimeren Komplex in der Membran des Netzwerkes (Labruyere *et al.*, 1999). Die Ausschaltung des für GRA6 kodierenden Gens führt zu einem fehlerhaften Aufbau des Netzwerkes (Mercier *et al.*, 2002).

## **C. Funktion der GRA-Proteine von *T. gondii***

GRA-Proteine sind wahrscheinlich wichtig für das intrazelluläre Überleben des Parasiten in der PV. Sie beteiligen sich möglicherweise an Mechanismen der Nährstoffaufnahme von der Wirtszelle und an der Abfallabgabe an die Wirtszelle. Genaue Funktionen konnten den meisten GRA-Proteinen bisher nicht zugeordnet werden (Sibley *et al.*, 1994). Detaillierte Funktionsbeschreibungen liegen zur Zeit nur für die NTPase vor. Die NTPase entfernt Phosphatreste von Nukleotiden, wodurch diese besser durch Membranen transportiert werden können. Dies könnte eine wichtige Funktion sein, da *Toxoplasma* keinen *de novo* Syntheseweg für Purine besitzt, und daher vom Wirt hergestellte Purine aufnehmen muss (Bermudes *et al.*, 1994; Sibley *et al.*, 1994).

GRA-Proteine spielen auch für die Abwehr gegen Toxoplasmen eine große Rolle. Die immunologisch bedeutsamen, sogenannten “excreted-secreted antigens” (ESA), deren Sekretion *in vitro* mit Hilfe von *foetal calf serum* (FCS) induziert werden kann, bestehen zum größten Teil aus GRA-Proteinen.

Die Rolle der “excreted-secreted antigens” bei der Induktion protektiver Immunreaktionen wurde in mehreren Toxoplasmosemodellen nachgewiesen. Eine Immunisierung von Mäusen mit einer ESA Präparation führt dazu, dass diese Tiere eine ansonsten letale orale Infektion mit Bradyzoiten überleben (Darcy *et al.*, 1992). Ferner wurde in einem Rattenmodell nachgewiesen, dass eine Immunisierung mit ESA's die transplazentare Infektionsrate drastisch vermindert.

### **I.2.3 Gezielter Transport von Mic-, Rop- und Gra-Proteinen zu den sekretorischen Organellen**

Der Transport der sekretorischen Proteine nach der Proteinbiosynthese zu den Mikronemen, Rhoptrien bzw. den Dichten Granula folgt teilweise dem klassischen sekretorischen Weg, die benutzte „Sorting“-Maschinerie ist ähnlich in eukaryotischen Zellen (Ngo *et al.*, 2000) zu finden.

Alle bekannten sekretorischen Proteine in *T. gondii* enthalten eine hydrophobe Signalsequenz, die für den Transport in das ER-Lumen (Kaasch & Joiner, 2000) von Bedeutung ist. Vom ER werden die Proteine dann wahrscheinlich über COPII-Vesikel in den Golgi Apparat transportiert.

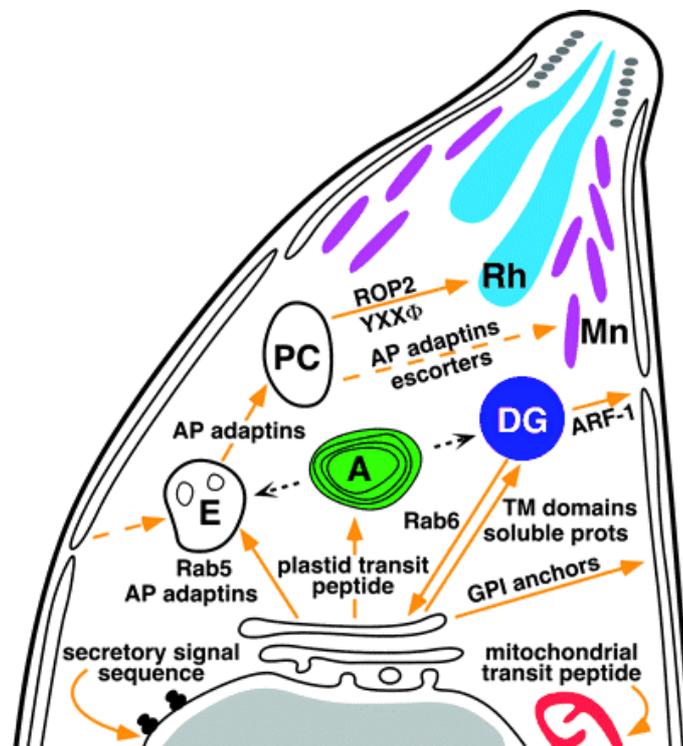
Es wird angenommen, dass die in den sekretorischen Organellen enthaltenen Proteine über den Golgi-Apparat transportiert werden. Dies ergibt sich aus Experimenten mit Brefeldin A und Mikrotubuli-Inhibitoren. Diese beiden Inhibitoren können den Proteintransport durch den Golgi Apparat hemmen. Es wurde gefunden, dass nach einer Blockade des Golgi-Apparates mit Brefeldin A und Mikrotubuli-Inhibitoren keine Proteine mehr in die sekretorischen Organellen gelangen (Stokkermans *et al.*, 1996; Karsten *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 1998; Hager *et al.*, 1999).

Das Trans-Golgi-Netzwerk gilt in eukaryotischen Zellen als „Sorting“-Station für die Proteine (Allan & Balch, 1999), dabei vermitteln spezifische „Targeting“-Signale den gerichteten Proteintransport. So fungiert zum Beispiel ein GPI Anker als Signal für den Transport von Oberflächenproteinen an die Plasmamembran (Karsten *et al.*, 1998).

Abgesehen vom Signalpeptid, sind zusätzliche „Targeting“-Signale für den Proteintransport in die Mikronemen (Carruthers *et al.*, 2000; Garcia-Reguet *et al.*, 2000; Brecht *et al.*, 2001)

und Rhoptrien bekannt (Bradley & Boothroyd, 2001); (Striepen *et al.*, 2001). Spezifische „Targeting“ Signale zum Transport in die Dichten Granula sind hingegen nicht bekannt, sondern alle Proteine, die keines der bekannten „Targeting“-Signale enthalten, werden in *T. gondii* in die Dichten Granula transportiert (Karsten *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 1998). Dies geht auch aus dem Befund hervor, dass *T. gondii* Proteine, deren spezifische Signale für andere Organellen deletiert wurden, in die Dichten Granula transportiert werden (Striepen *et al.*, 1998; Striepen *et al.*, 2001; Reiss *et al.*, 2001).

Insgesamt scheinen die Dichten Granula daher Ähnlichkeiten mit den in Eukaryonten zu findenden Post-Golgi-Vesikeln zu haben (z.B. in sekretorischen Zellen von Säugetieren wie z.B. neuroendokrine und exokrinen Drüsenzellen), die in der konstitutiven Protein-Sekretion involviert sind.



**Abb.4: Post-Golgi Protein targeting im *T. gondii* sekretorischen Transportweg**

A, Apicoplast; DG, dense granules; E, endosome; Mn, micronemes; PC, precursor compartment; Rh, rhoptries; ARF-1, ADP-ribosylation Factor 1; Rab5/6, GTP-binding proteins; YXX-motifs, protein bearing transmembrane domain (Joiner & Roos, 2002).

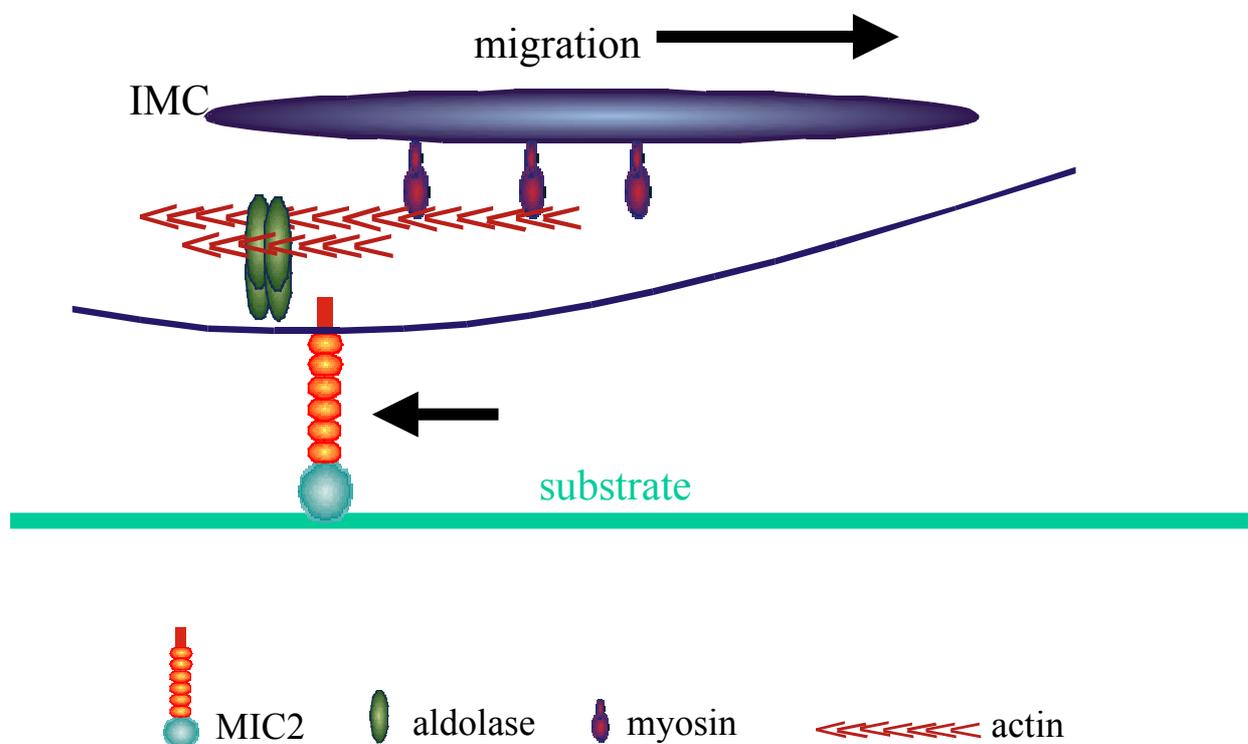
### I.2.5 Fortbewegung von *T. gondii*

Die polarisierte Sekretion und die besondere Fortbewegung der Apikomplexa, die „gleitende Fortbewegung“ oder *gliding motility*, sind vom Zytoskelett abhängig (Frixione *et al.*, 1996; Nichols & Chiappino, 1987). Die Zoitenformen der Apicomplexa besitzen keine Cilien oder Flagellen für die Fortbewegung auf festen Oberflächen (Sibley *et al.*, 1998). Ältere Untersuchungen schlagen ein Modell vor, bei dem die Bewegung abhängig ist von der Adhäsion von Parasiten-Proteinen an Oberflächen. Durch die Wanderung der Proteine in Richtung des posterioren Endes des Parasiten wird ein Vorwärtstrieb erzeugt.

Jüngere Untersuchungen *in vitro* zeigen, dass sich die Gleitbewegung aus drei Bewegungen zusammensetzt (Hakansson *et al.*, 1999):

- kreisförmiges Gleiten gegen den Uhrzeigersinn,
- aufrechtes Herumwirbeln („twirling“),
- und helikale Rotation.

Alle Vertreter der Apicomplexa weisen diese typische Fortbewegung auf. Es wurde gezeigt, dass die Bewegung durch das subkortikale Aktin-Myosin-Skelett des Parasiten vorangetrieben wird (Dobrowolski *et al.*, 1997). Die Bindung an eine Oberfläche ist eine wichtige Voraussetzung für diese Art der Bewegung.



**Abb. 5: Modell der gleitenden Bewegung.**

IMC, inner membran complex ; MIC2, microneme protein 2 (Jewett & Sibley, 2003)

Die Adhäsine aus der Thrombospondin-Familie (TRAP-Familie) der Mikronemenproteine können an weitverbreitete Oberflächenmoleküle binden und sie besitzen eine putative Transmembrandomäne. Daher sind sie mögliche Kandidaten für die Herstellung der Verbindung zwischen dem Bewegungsapparat des Parasiten und der extrazellulären Oberfläche. An der Plasmamembran wurde das *T. gondii*-Myosin A (TgM-A) nachgewiesen, wodurch es eine ideale Position hat, um eine Funktion als Motor im Modell der gleitenden Bewegung zu erfüllen (Hettmann *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass sich das Mikronemenprotein MIC2 durch das Aktin-Myosin-Skelett zum posterioren Pol bewegt und dadurch der Parasit vorwärts geschoben wird (Carruthers *et al.*, 2000; Huynh *et al.*, 2003).

### **I.2.6 Invasion von Wirtszellen durch *T. gondii* und die Entstehung der parasitophoren Vakuole**

*Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, und muss daher zur Vermehrung in Wirtszellen eindringen. Diese Zellinvasion ist ein aktiver Prozess, der vom Parasiten durchgeführt wird. Dabei sind die obligat intrazellulären Parasiten bei der Invasion häufig auf das Zytoskelett der Wirtszelle angewiesen, *Toxoplasma gondii* nimmt hier jedoch eine Sonderstellung ein: Toxoplasmen sind von der Art des Zytoskeletts der Wirtszelle unabhängig und brauchen nur das eigene Zytoskelett, um erfolgreich in Wirtszellen eindringen zu können (Dobrowolski & Sibley, 1996).

Der Invasionsprozeß, der innerhalb von 30 Sekunden abgeschlossen ist (Opitz & Soldati, 2002), kann in mehrere Schritte unterteilt werden:

- I Zellerkennung und Reorientierung
- II Bindung an die Wirtszelle
- III Invasion und Einstülpung der parasitophoren Vakuole
- IV Verschließen der parasitophoren Vakuole

Für die Invasion von *T. gondii* ist nach einer Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle die exakte Ausrichtung notwendig, dabei muss das apikale Ende des Parasiten auf die Wirtszelle ausgerichtet werden. An der Invasionsstelle, an der die Wirtszell- und Parasiten-Plasmamembran aufeinandertreffen, bildet sich eine Struktur, die „moving junction“ genannt wird. Es folgt die Ausschüttung des Mikronemeninhalts durch Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der frühen Phase des Anheftungs- und Invasionsprozesses. Die Mikronemenproteine stabilisieren die Adhärenz zwischen Parasit und Wirtszelle im Vorfeld

der Invasion. Während der Invasion, wird dann die Wirtszellplasmamembran eingestülpt und die Rhoptrien entleeren ihren Inhalt in die entstehende parasitophore Vakuole.

Die durch den Invasionsprozess entstehende parasitophore Vakuole besitzt ungewöhnliche Eigenschaften. So wurde gefunden, dass die PV nicht mit zytoplasmatischen Vesikeln der Wirtszelle fusioniert, damit findet keine sekundäre Ansäuerung statt, die zu einem Abtöten der Parasiten führen würde. Ebenso findet auch keine Fusion mit Vesikeln statt, die zeitgleich mit dem Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle aufgenommen wurden. Die Azidifikation dieser zeitgleich aufgenommenen Vesikel ist jedoch nicht gestört (Jones & Hirsch, 1972; Sibley *et al.*, 1985).

Obwohl die PVM der neu gebildeten PV von der Wirtszellmembran abstammt, sind viele Oberflächenantigene der Wirtszelle nicht mehr auf der PVM nachweisbar (Dubremetz & Schwartzman, 1993). Dies ist z.T. auf eine aktive Elimination der Wirtszellproteine zurückzuführen. Gleichzeitig findet mit der Einstülpung der Wirtszellmembran wahrscheinlich eine Veränderung der Anordnung der Lipide in der Wirtszellmembran statt, die verhindert, dass Membranproteine der Wirtszelle in die entstehende Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) diffundieren (Dubremetz & Schwartzman, 1993).

Trotz des effizienten Ausschlusses von Transmembran-Proteinen der Wirtszellmembran, verbleiben GPI-verankerte Wirtsproteine oder Proteine ohne zytoplasmatische Domäne teilweise in der PVM erhalten (Mordue *et al.*, 1999). Während der Invasion werden Proteine der Rhoptrien in die PVM eingebaut (Carruthers & Sibley, 1997; Beckers *et al.*, 1994). Die Verminderung der Wirtszellproteine in der PVM hilft dabei, eine Fusion der Vakuole mit dem endosomalen System zu verhindern. Die PV fusioniert weder mit dem lysosomalen (Joiner *et al.*, 1990) noch mit dem endosomalen Kompartiment (Jones & Hirsch, 1972). „Patch-Clamp“-Untersuchungen, während der Invasion von *T. gondii*, führen zu der Annahme, dass die Lipide der PVM zum größten Teil von der Wirtszelle stammen (Suss-Toby *et al.*, 1996), während die Proteine in der PVM hauptsächlich vom Parasiten selbst synthetisiert werden.

Eine weitere wichtige Funktion der PV ist die schnelle Interaktion mit Wirtszell-Mitochondrien und dem Wirtszell-ER (Porchet-Hennere & Nicolas, 1983; Sinai *et al.*, 1997). Diese Wirtsorganellen gehen eine enge Wechselwirkung mit der Vakuolenmembran ein und bereits 4 Stunden nach der Infektion sind fast 75% der Oberfläche der PV mit diesen Wirtszellstrukturen bedeckt (Sinai *et al.*, 1997).

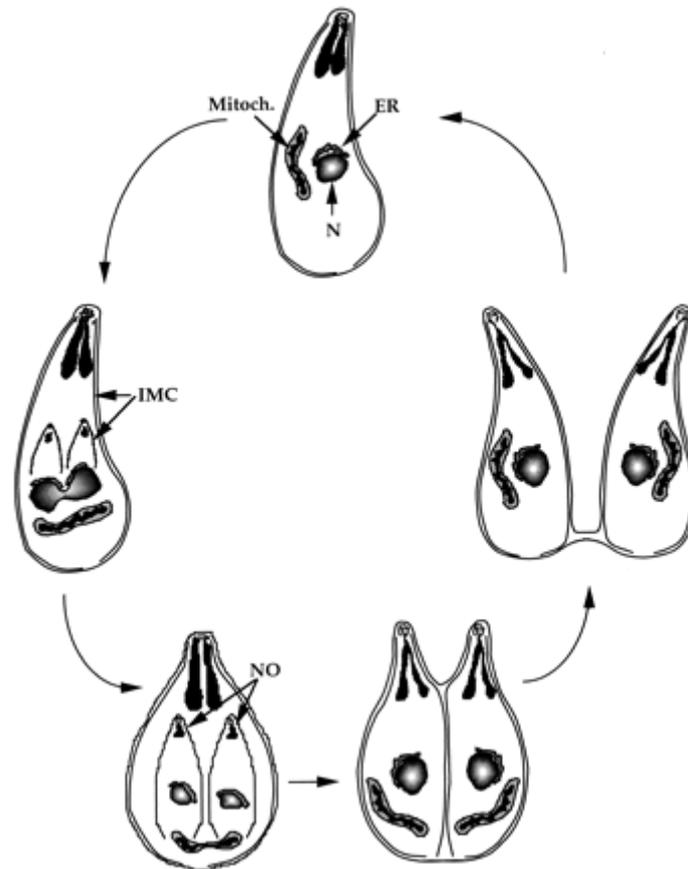
Mit dem vollständigen Eindringen des Parasiten und der Entstehung der parasitophoren Vakuole ist der Invasionsprozess abgeschlossen. (Carruthers & Sibley, 1997). Erst danach wird der Inhalt der Dichten Granula nach Fusion der Transportvesikel mit der

Plasmamembran des Parasiten freigesetzt. Dies erfolgt, wie bereits erwähnt, hauptsächlich am apikalen Ende des Parasiten (Dubremetz *et al.*, 1993; Leriche & Dubremetz, 1990). Einige der GRA Proteine werden dann in die PVM eingebaut (Ossorio *et al.*, 1994). Die Funktion dieser Proteine in der PVM ist noch nicht klar. Man nimmt an, dass sie die Poren für die Diffusion kleiner Moleküle (1300-1900 Dalton) in die Vakuole bilden (Schwab *et al.*, 1994) oder bei der Assoziation der PVM mit dem ER und den Mitochondrien der Wirtszelle eine Rolle spielen. Allgemein wird angenommen, dass die Proteine in der PVM maßgeblich am Stoffaustausch zwischen Wirtszelle und Parasit beteiligt sind (Sinai *et al.*, 1997).

### **I.2.7 Asexuelle Vermehrung und Egression aus der parasitophoren Vakuole**

*Toxoplasma* besitzt eine besondere Form der asexuellen Vermehrung, die sogenannte Endodyogenie (van der & Piekarski, 1967). Hierbei findet die Vermehrung innerhalb der Wirtszelle statt, wobei in einer Parasitenzelle zwei Tochterzellen entstehen. Die zellulären Signale und die für diesen Prozess nötige Maschinerie sind weitgehend unbekannt. Bei der Teilung bleibt die Kernhülle zunächst intakt, während der Apicoplast und die Mitochondrien zwischen den beiden Tochterzellen aufgeteilt werden. Erst danach findet die Kernteilung statt. Die von der Mutterzelle stammende Plasmamembran bildet auch wieder die Plasmamembran der beiden Tochterzellen. Vom anterioren Ende her bildet sich eine Teilungsfurche bis hin zum posterioren Ende der beiden Tochterzellen, wo die Parasiten jedoch nicht völlig getrennt werden, sondern über einen schmalen Bereich der ursprünglichen Mutterzelle, den sogenannten *residual body* (Black & Boothroyd, 2000), verbunden bleiben. Die Verbindung führt bei weiteren Replikationen zur Bildung von Parasiten-Rosetten innerhalb der Vakuole, wobei die freien anterioren Enden der Parasiten vom Zentrum wegzeigen.

Diese besondere Form der Vermehrung, bei der das Zytoskelett und das organelläre Netzwerk fast die ganze Zeit hindurch intakt bleiben, ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die Parasiten fast zu jedem Zeitpunkt während der intrazellulären Phase die Zelle verlassen und neue Wirtszellen befallen können (Endo *et al.*, 1982). Die Generationszeit der Tachyzoiten *in vitro* beträgt 6 bis 8 Stunden. Sie verlassen die Wirtszelle durch Lyse, nachdem sich in der PV etwa 64 bis 128 Parasiten gebildet haben (Radke & White, 1998). Der für die Egression verantwortliche Stimulus ist nicht bekannt, beschrieben ist lediglich, dass eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalts vor der Egression erfolgt (Endo *et al.*, 1982).



**Abb.6: Diagramm der Endodyogenie. Entstehung von zwei Tochterzellen innerhalb einer Mutterzelle.** Nascent apical organelles (NO); inner membrane complex (IMC); nucleus (N); mitochondrion (Mitoch.); endoplasmatic reticulum (ER) (Black & Boothroyd, 2000)

### I.3 Genetik von *T. gondii*

#### I.3.1 Das Genom von *Toxoplasma gondii*

Das nukleäre Genom von *T. gondii* umfasst ca. 80 Megabytes (Mb) (Cornelissen *et al.*, 1984) und ist in 11 Chromosomen organisiert, deren Größe zwischen 2 Mb und mehr als 10 Mb liegt (Sibley *et al.*, 1992). Alle Zystenstadien (Sporozoiten, Tachyzoiten, Bradyzoiten) sind haploid, die Oocyste (Zygote) ist diploid. Aus ihr gehen durch Meiose und Mitose 8 haploide Sporozoiten hervor.

In den Mitochondrien befindet sich zusätzlich ein Multikopien-Element von 6 bis 7 Kilobasen (kb), das für Proteine der Atmungskette und stark fragmentierte rRNAs kodiert (Vaidya *et al.*, 1989). Die Parasiten des Stammes Apicomplexa besitzen ein weiteres DNA-enhaltendes, chloroplastenartiges Organell, den sogenannten Apicoplasten. Der Apicoplast ist zwischen dem Kern und dem Apicalkomplex lokalisiert (siehe Abbildung 3). Der Apicoplast enthält ein zirkuläres 35 kb großes Genom. Er ist ein durch Endosymbiose erworbenes und von 4

Membranen umgebenes Plastid, in dem wahrscheinlich keine Photosynthese mehr stattfindet (Fichera & Roos, 1997). Die im Apicoplast lokalisierten Biosynthesewege, wie der Mevalonat-unabhängige Biosyntheseweg für die Herstellung von Isoprenoiden (Jomaa *et al.*, 1999), sind potentielle Angriffspunkte von Chemotherapeutika gegen Apicomplexa z.B. *Toxoplasma* oder Plasmodien.

Die Identifikation von Genen, die nur auf Apicomplexa beschränkt sind, ist aus mehreren Gründen von besonderem Interesse. Zum einen können dadurch potentielle Ziele für die Medikamenten- und Vakzine-Entwicklung gefunden werden (Vercammen *et al.*, 2000), zum anderen ist man daran interessiert, die für den intrazellulären Parasitismus notwendigen Gene funktionell zu verstehen.

### **I.3.2 Gen-Expression in *T. gondii***

Mehrere experimentelle Untersuchungen belegen, dass die Gen-Expression in *T. gondii* transkriptional reguliert wird (Soldati & Boothroyd, 1995; Mercier *et al.*, 1996; Nakaar *et al.*, 1998), obwohl die gewöhnlich bei eukaryotischen Zellen bekannten *cis-acting*-Motive in der Promotorregion, wie z.B. TATA-box oder SP1, bei *T. gondii* nicht vorhanden sind.

Die Analyse der *upstream* Sequenzen mehrerer Gene von *T. gondii* hat ein hoch konserviertes Heptanukleotidmotiv **T/AGAGACG** identifiziert (Soldati & Boothroyd, 1995; Mercier *et al.*, 1996; Nakaar *et al.*, 1998), das wahrscheinlich die Funktion der *cis-acting* Motive übernimmt. Die Regulation der GRA-Gene ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung. GRA-Gene sind *single copy*-Gene und haben, abgesehen von GRA2, kein *Intron*. Das oben genannte Heptanukleotidenmotiv ist bei den GRA-Genen variabel in Anzahl, Position und Orientierung, ferner sind Umstellungen innerhalb der oben genannten Sequenz beschrieben. (Mercier *et al.*, 1996). GRA5 enthält zwei gleich orientierte Motive, wogegen GRA1 sechs in unterschiedlichen Richtungen orientierte Motive aufweist.

Für *T. gondii*-Tachyzoiten existiert eine EST-Datenbank („Expresse Sequence Tag“) mit mehr als 10.000 ESTs. Eine Reihe von Proteinen konnte durch Vergleich mit bestehenden Datenbanken anderer Organismen identifiziert werden. Dennoch gehören 50% der ESTs zu Genen, denen bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (Ajioka, 1998).

#### I.4 *T. gondii* im Labor

*T. gondii* kann aufgrund seiner guten Zugänglichkeit für genetische Analysen als ein Modellsystem für den intrazellulären Parasitismus betrachtet werden. Mit Hilfe von Standard Zellkultur-Techniken ist der Parasit (Tachyzoiten) leicht in Kultur zu halten. Durch das haploide Genom ist das Verändern oder Eliminieren eines Gens im Vergleich zu diploiden Organismen stark vereinfacht. *T. gondii* ist das erste obligat intrazelluläre Protozoon, das mit einer exogenen DNA transformiert wurde (Donald & Roos, 1993; Soldati & Boothroyd, 1993). Dabei ist zu beachten, dass Promotoren von höheren Eukaryonten und Viren in *T. gondii* nicht aktiv sind, so dass toxoplasmeneigene Promotoren benötigt werden.

Durch Elektroporation kann *T. gondii* transient oder stabil mit Plasmid-DNA transfiziert werden (Soldati, 1996). Da die Tachyzoiten von *T. gondii* haploid sind, können Mutationen oder Deletionen nur in nicht-essentiellen Genen eingeführt werden. Eine konditionale Mutation von essentiellen Genen ist möglich (Meissner *et al.*, 2002).

Für den „Knock-out“ eines einfach im Genom vorkommenden Gens ist es ausreichend, das vorhandene Allel zu entfernen. Eine Möglichkeit, einen „Knock-out“ für Proteine zu erreichen, ist die Funktion des zu zerstörenden Gens, durch ein anderes Gen zu komplementieren. Gezieltes Ersetzen von Genen über homologe Rekombination erfordert lange flankierende Regionen im 5'- und 3' Bereich der genomischen DNA. Eine weitere Möglichkeit zum Ausschalten von Genen stellt die zweistufige „Hit-and-run“ Mutagenese dar (Donald & Roos, 1994). Außerdem können *Antisense*-Techniken verwendet werden, um die Menge an Genprodukten zu verringern (Nakaar *et al.*, 1999; Nakaar *et al.*, 2000) und essentielle Gene partiell oder konditional auszuschalten (Meissner *et al.*, 2002).

Wichtig für molekularbiologische Arbeiten ist, dass zur Selektion und zur Erkennung von Transformanten Selektionsmarker und Reportersysteme zur Verfügung stehen. Seit Jahren gibt es verschiedene Selektionsmarker, die jedoch z.T. auch die Wirtszelle in Mitleidenschaft ziehen: *Chloramphenicolacetyltransferase* (*CAT*) (Kim *et al.*, 1993), *Dihydrofolat-Reduktase-Thymidilat-Synthase* (*DHFRTS*) (Donald & Roos, 1993), *Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase* (*HXGPRT*) (Donald *et al.*, 1996) und *Tryptophan-Synthase* (Sibley *et al.*, 1994). Diese Marker wurden sowohl für die homologe Rekombination (Donald & Roos, 1994; Kim *et al.*, 1993), als auch für die Insertionsmutagenese verwendet (Donald & Roos, 1995; Knoll & Boothroyd, 1998).

Als Reportergene eignen sich die von *E. coli* abgeleitete  $\beta$ -Galaktosidase (Seeber & Boothroyd, 1996), die *Chloramphenicolacetyltransferase* (Soldati & Boothroyd, 1993) und eine modifizierte Version des *GFP* (*Green fusion protein*) (Striepen *et al.*, 1998).

## I.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, das von der Arbeitsgruppe Däubener neu isolierte *T. gondii* B10 Protein biochemisch und funktionell weiter zu charakterisieren. Das B10 Gen wurde bei der Analyse einer cDNA Bank von *Toxoplasma gondii* mit Antisera von Toxoplasmosepatienten erstmals gefunden.

Untersuchungen der genomischen B10 Sequenz zeigten, dass es sich um ein aus zwei Exons zusammengesetztes „single copy“ Gen handelt. Die korrespondierende 1528 bp lange B10 cDNA kodiert für ein relativ hydrophiles Protein von 318 Aminosäuren, das neben einer N-terminalen Signalsequenz über keine weiteren möglichen Transmembrandomänen verfügt. B10 wurde vorläufig als Mitglied der „excreted secreted antigens“ (ESA) von *T. gondii* erkannt.

Aus medizinischer Sicht ist insbesondere die Tatsache interessant, dass viele Toxoplasmosepatienten Antikörper, auch der Klasse IgM, gegen dieses Protein aufweisen. Damit könnte das Protein für diagnostische Zwecke eingesetzt werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass T-Zellen aus dem Blut von Toxoplasmosepatienten das B10 Antigen erkennen. Da zelluläre Immunreaktionen wesentlich zur Abwehr des Parasiten beitragen, ist das B10 Protein ein interessanter Kandidat zur Entwicklung einer Vakzine.

Während schon einige Befunde zur Rolle von B10 bei der Immunabwehr vorliegen, ist die Funktion von B10 für den Parasiten noch unbekannt. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die genaue Lokalisierung und Proteinfamilienangehörigkeit des B10 Proteins im Parasiten durch Immunfluoreszenz-Analysen und Elektronenmikroskopie definiert werden. Darüber hinaus sollte mittels Zellfraktionierungsmethoden und biochemischen Untersuchungen die zelluläre Verteilung und die posttranslationalen Veränderungen des B10 Proteins sowie dessen Interaktion mit anderen Proteinen und mit membranösen Strukturen analysiert werden. Zur weiteren funktionellen Analyse sollten Mutanten erzeugt werden, die B10 entweder überexprimieren oder defizient für dieses Protein sind. Danach sollten die B10-Mutanten phänotypisch mit dem Ausgangsstamm verglichen werden.

## II. Material und Methoden

### II.1. Material

#### II.1.1 Allgemeines

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

#### II.1.2 Plasmide

pGEM-T easy :	Promega, Madison, USA
pTubble3'SAG:	freundliche Gabe von Corinne Mercier, Grenoble, Frankreich
pTub+Myc:	freundliche Gabe von Boris Striepen, Athens, USA
pLDH1+Myc:	in dieser Arbeit hergestellt
pGRA9+Myc:	in dieser Arbeit hergestellt
pGEM-T5'FGRA9:	in dieser Arbeit hergestellt
pGEM-T3'FGRA9:	in dieser Arbeit hergestellt
pGRA9KO-5'F:	in dieser Arbeit hergestellt
p5'G9ble3'G9:	in dieser Arbeit hergestellt

#### II.1.3 Proteine

##### II.1.3.1 Antikörper

anti-B10:	Eurogentec, Belgien
anti-c-myc:	Oncogene, Cambridge , UK
anti- <i>T.g.</i> -4F8:	(Fischer <i>et al.</i> , 1997)
anti- <i>T.g.</i> -LDH1:	Reichmann <i>et al.</i> (2001)
anti- <i>T.g.</i> -GRA1:	M-F. Cesbron-Delauw, Grenoble, Frankreich
anti- <i>T.g.</i> -GRA2:	M-F. Cesbron-Delauw, Grenoble, Frankreich
anti- <i>T.g.</i> -GRA5:	M-F. Cesbron-Delauw, Grenoble, Frankreich
anti- <i>T.g.</i> -MIC2:	J-F. Dubremetz, Montpellier, Frankreich
anti- <i>T.g.</i> -MIC4:	Dominique Soldati, London, UK
anti- <i>T.g.</i> -ROP1	Dominique Soldati, London, UK
anti- <i>T.g.</i> -SAG1:	M-F. Cesbron-Delauw, Grenoble, Frankreich

anti-myc: Roche Diagnostics, UK

### II.1.3.2 Restriktionsenzyme

*ApaI*: Promega, Madison, USA  
*AvrII*: NEB, Beverly, USA  
*BamHI*: Invitrogen, Karlsruhe  
*BglII*: NEB, Beverly, USA  
*DraI*: Clontech, San Diego, USA  
*EcoRI*: Promega, Madison, USA  
*HindIII*: Promega, Madison, USA  
*KpnI*: NEB, Beverly, USA  
*NsiI*: NEB, Beverly, USA  
*PacI*: NEB, Beverly, USA  
*SacI*: NEB, Beverly, USA  
*StuI*: Clontech, San Diego, USA  
*XhoI*: Promega, Madison, USA

### II.1.3.2 Sonstige Enzyme

DNase I: Roche, Mannheim  
Expand-High-Fidelity-DNA-Polymerase Roche, Mannheim, Germany  
Meerrettichperoxidase (HRP): Sigma, St. Louis, USA  
Proteinase K: Roche, Mannheim, Germany  
RNase A: Roche, Mannheim, Germany  
Shrimp alkalische-Phosphatase: Roche, Mannheim, Germany  
Taq-Polymerase: Roche, Mannheim, Germany  
Trypsin: Roche, Mannheim, Germany

### II.1.4 Nukleinsäuren, Desoxyoligonukleotide und Nukleotide

#### Nukleinsäuren

kb-Leiter: Invitrogen, Karlsruhe

**Desoxyoligonukleotide**

D <sub>1</sub> for:	ATGAAAAATGCCAACCGAAGAAGGCGAGTTT
D <sub>1</sub> rev:	TTAAGTTTCTCTGCATCGACAAGTGCTAAC
ForBleo:	TGCATGCATCAAGCGACGCCCAACCTGCC
RevBleo:	GCATTAATTAAGAGATGCCTGCAAGCAATTCG
KpnI-NK-Fla5for:	ATATGGTACCACAGTCGAAAAATCAAGTTCTGAGGC
NsiI-NK-Fla5rev:	GCGCATGCATTTTCCACCCAGATACTGCCGCGAAA
PacI-NK-Fla3for:	GCGCTTATTTAACAAGCCTGAAGAAAAACGATTCTGA
SacI-NK-Fla3rev:	ATATGAGCTCAGCGGTCTGTCTGGACTCGTCCTA
BglII-G9-mycfor:	ATCATGAAGATCTAAAATGCGGGTCACTCAAGTCAAT
Avr2-G9-mycNSr:	ATCGACCTAGGGAGTCCTCGGTCTTCTGCGA
AP1:	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2:	ACTATAGGGCACGCGTGGT

**Nukleotide**

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat:	Boehringer, Mannheim, Germany
2'-Desoxycytidin-5' [ $\alpha$ 32P]-triphosphat:	Hartmann, Braunschweig, Germany
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat:	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat:	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat:	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat:	Boehringer, Mannheim

**II.1.5 Medien und Puffer**

Iscove's modified Dulbecco's medium: (IMDM) + 25 mM HEPES, ohne Glutamin	BioWhittaker, Verviers, Belgien
Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.3:	Serag Wiessner, Naila
TBE-Puffer:	89 mM Tris-HCl, pH 7 89 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
TE-Puffer :	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA

Zell-Medium: IMDM+  
1% (v/v) Glutamin  
5% (v/v) FCS  
25µg/ml Gentamycin

### II.1.6 Feinchemikalien

(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) IPTG:	ICN, Costa Mesa, USA
4',6-diamino-2-phenylindole-dihydrochlorid-hydrate (DAPI):	Boehringer, Mannheim
Aceton:	Merck, Darmstadt
Acrylamid:	Serva, Heidelberg
Agarose:	Biozym, Hameln
Ammoniumoxalat:	Sigma, St. Louis, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS):	Merck, Darmstadt
Ampicillin:	Boehringer, Mannheim
Borsäure:	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumine, cell culture tested:	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau:	Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> :	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid:	ICN, Aurora, USA
CHAPS:	Fluka, Buchs, CH
Chloramphenicol:	Sigma, St. Louis, USA
Chloroform:	Merck, Darmstadt
Coomassie Blue G:	Sigma, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue R250:	Serva, Heidelberg
Diethylether:	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC):	Sigma, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO):	Sigma, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT):	apbiotech, Freiburg
Ethanol 97%:	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid:	Boehringer, Mannheim
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA), cell culture tested:	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll Typ 400:	apbiotech, Freiburg
Fluoromount-G SBA:	Birmingham, USA
Formaldehyd:	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert Cytogen:	Princeton, USA

---

Glutamin (200 mM):	BioWhittaker, Belgien
Gluthation:	Merck, Darmstadt
Glycerin:	Merck, Darmstadt
Glycin:	Merck, Darmstadt
Guanidinium-Isothiocyanat (GSCN):	Sigma, St. Louis, USA
Harnstoff:	Merck, Darmstadt
HEPES:	Sigma, St. Louis, USA
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid:	Merck, Darmstadt
Kanamycin:	Boehringer, Mannheim
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Merck, Darmstadt
Kristallviolett:	Merck, Darmstadt
LB-Agar:	Gibco BRL, Eggenstein
LB-Medium:	Gibco BRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid:	Merck, Darmstadt
Milchpulver Oxoid:	Basingstoke, GB
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine:	Sigma, St. Louis, USA
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED):	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat:	Merck, Darmstadt
Natriumazid:	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat:	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid:	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS):	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat:	Merck, Darmstadt
n-Butanol:	Merck, Darmstadt
N-Laurylsarkosin:	Sigma, St. Louis, USA
Parafinöl:	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd:	Sigma, St. Louis, USA
Phenol/Chloroform:	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure 85%:	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid:	Sigma, St. Louis, USA
Salzsäure:	Merck, Darmstadt

Schwefelsäure:	Merck, Darmstadt
Silbernitrat:	Merck, Darmstadt
Thioglykolat:	Sigma, St. Louis, USA
Thioharnstoff:	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris):	Merck, Darmstadt
Triton X-100:	Sigma, St. Louis, USA
Triton X-114:	Sigma, St. Louis, USA
Trypanblau:	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% w/v):	Biochrom, Berlin
Tween-20:	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid:	Merck, Darmstadt
Xylencyanol:	Merck, Darmstadt
Zinksulfat:	Sigma, St. Louis, USA

### II.1.7 Sonstige Materialien und Geräte

Basic-96-Harvester (Zellerntegerät):	Zinser analytic Skatron, Frankfurt
BetaPlate Scint (Szintillationsflüssigkeit):	LKB Wallac, FIN
CO <sub>2</sub> -begaster Brutschrank (Heraeus B5060 EK/CO <sub>2</sub> ):	Heraeus, Hanau
ELISA-Photometer:	Tecan
Phosphor Image FLT 3000:	Fujifilm
Nylonmembran Hybond N+ :	apbiotech, Freiburg
Glasfaserfilter (Preprint Filtermat):	LKB Wallac, FIN
Kodak X-OMAT, AR Film, XAR-5 Kodak:	Rochester, USA
Nitrozellulosemembran „Protran“ 0,45 µm Schleicher & Schüll, Dassel	
Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A):	Flow Laboratories, Meckenheim
1205 Betaplate (Szintillationszähler):	LKB Wallac, FIN
96-well Immunoplate Maxisorp F96:	Nunc, Wiesbaden
Röntgenfilme X-OMAT:	Kodak, New York, USA
3 µm-Filter Millipore:	Schwalbach

## II.1.8 Organismen

### II.1.8.1 Mausstämme

NMRI-Mäuse: Tierversuchsanlage Düsseldorf

### II.1.8.2 Zelllinien

L929 : Sanford *et al.*, 1948, ATCC, Manassas, USA

HFF Kinderklinik UKD, Düsseldorf, Deutschland

### II.1.8.3 *Toxoplasma gondii* Stämme

BK: Winser *et al.*, 1948, Seitz, Parasitologie, Bonn

RH<sup>-</sup>GRA9+Myc: in dieser Arbeit hergestellte Mutante

RH<sup>-</sup>GRA9+GFP: in dieser Arbeit hergestellte Mutante

RH<sup>-</sup> ΔGRA9: in dieser Arbeit hergestellte Mutante

DX: Schlüter *et al.*, 1991, Institut für Medizinische Pathologie, Bonn

RH: Sabin, 1941, ATCC, Manassas, USA

RH *hxgprt*- Donald *et al.*, 1996, ATCC, Manassas, USA

### II.1.8.4 Bakterien

*E. coli*: XL1blue *endA1 hsdR17(rK12-mK12+)supE44 thi-1recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proA+B+lacIqZ .M15::Tn10(TcR)*] Stratagene, Amsterdam, Niederlande

*E. coli*: BL21(DE3)pLysS F- *ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm* (DE3) pLysS (CmR)Novagen, Bad Soden

## II.2 Methoden

### II.2.1 Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturen wurden bei 37°C in einem Brutschrank in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 10% (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilbank unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Zellkulturabfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert. Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, 2 bis 3 bar) autoklaviert.

Temperaturempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe einer 0,2 µm Membran („Bottle top filter“, Schleicher & Schüll, Dassel) steril filtriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210 °C hitzesterilisiert.

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

Für die Sicherung der Zelllinien wurden ca.  $10^7$  Zellen in 1000 µl FCS/10% DMSO aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

## **II.2.2 Kultivierung und Einfrieren von Zelllinien**

### **II.2.2.1 L929 Fibroblasten**

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

### **II.2.2.2 HFF Fibroblasten (human foreskin fibroblast)**

Die humane Fibroblastenlinie wächst stark adhärent und bildet stabile Monolayer aus. Zum Ernten wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Die Flasche wurde mit 10 ml Zell-Medium ausgespült und anschließend bei 300 x g für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Zur Expansion der Zellkultur wurden die geernteten Zellen 1:3 verdünnt in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden bis zur 32. Passage kultiviert. HFF dienten als Wirtszelle für RH- und BK-Toxoplasmen.

### **II.2.2.3 Toxoplasmen**

#### **II.2.2.3.1 *In vitro* Kultivierung und Konservierung**

*T. gondii*-Isolate der Stammgruppe I, die in Zellkultur nur Tachyzoiten ausbilden (z.B. die Stämme BK und RH sowie deren Derivate) wurden in L929 oder HFF Zellen kultiviert. Bei einem Parasit/Wirtzell-Verhältnis von 5:1 waren alle Wirtszellen zwei bis drei Tage nach Infektion lysiert. Die freigesetzten, extrazellulären Toxoplasmen wurden abgospült und mit

Hilfe einer differentiellen Zentrifugation von den übrigen Wirtszellbestandteilen getrennt. Der erste Zentrifugationsschritt wurde bei 50 x g für fünf Minuten (Sedimentation von Wirtszellbestandteilen) und der zweite bei 600 x g für 15 min (Sedimentation der Toxoplasmen) durchgeführt. Für die Weiterkultivierung wurden die Wirtszellen mit einem fünffachen Parasitenüberschuß infiziert. Für die Präparation von Toxoplasma-Lysat wurden die Toxoplasmen zweimal mit PBS gewaschen (15 min, 600 x g, 4 °C) und das Pellet bei -70°C gelagert.

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

### **II.3 Gewinnung von Hirnzysten**

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

### **II.4 Mikrobiologische Methoden**

#### **II.4.1 Haltung von Bakterienstämmen**

Alle benutzten Bakterienstämme wurden vor der Benutzung aus tief gefrorenen Stocks auf LB-Agar Platten (ggf. supplementiert mit Antibiotika) ausgestrichen und bei 37°C bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Die kurzfristige Lagerung neuer Stämme erfolgte durch Haltung der Bakterien bei 4°C auf LB-Agar Platten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen wurden. Zur langfristigen Sicherung wurde 1 ml einer

ü.N. Kultur (LB-Medium) in einem sterilen Kryogefäß mit 200 µl sterilem 87% (v/v) Glycerin versetzt, 30 min bei RT inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C als Stock gelagert.

#### **II.4.2 Anzucht von Übernacht-Kulturen (ü.N.-Kulturen)**

Zur Anzucht von ü.N.-Bakterienkulturen wurden Einzelkolonien von einer LB-Platte in 5 ml LB-Medium, dem gegebenenfalls Antibiotikum zugesetzt wurde, überimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C ü.N. inkubiert.

#### **II.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen**

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen wurde nach der von Dagert und Ehrlich (1979) publizierten Methode verfahren. Dazu wurden 100 ml LB Medium mit 1 ml einer ü.N.-Kultur des entsprechenden *E. coli* Stammes beimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD600) von 0,5 angezogen. Nach Umfüllen der Kulturen in sterile 50 ml Röhrchen wurden diese 20 min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 3750 x g, 4°C (Heraeus Zellkulturzentrifuge) im Ausschwingrotor. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert (50% des Ausgangsvolumens) und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach Resuspension wurde erneut wie oben zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 0,085 M CaCl<sub>2</sub> mit 15% Glycerin (1/25 des Ausgangsvolumens) vorsichtig resuspendiert. Die resuspendierten kompetenten Zellen wurden in Aliquots zu je 200 µl in sterile Eppendorfgefäße überführt und anschließend für ein bis 24 h bei 4°C inkubiert. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### **II.4.4 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen**

Zur Transformation kompetenter Zellen wurde die Methode nach Hanahan (1985) angewandt. 200 µl transformationskompetenter *E. coli* Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Plasmid-DNA (ca. 5 bis 10 ng) vorsichtig mit den Zellen vermischt und 60 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90s bei 42°C. Im Anschluß daran wurde der Ansatz mit 800 µl LB-Medium (vorgewärmt auf 37°C) versetzt und 60 bis 90 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 200 µl des Ansatzes auf LB-Platten ausgestrichen und die Platten ü.N. bei 37°C inkubiert.

## **II.5 Molekularbiologische Methoden**

### **II.5.1 UV/VIS-Spektroskopie**

#### **II.5.1.1 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren**

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

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

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

Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) gibt hier Auskunft über mögliche Verunreinigungen der Nukleinsäuren. Bei reinen Präparationen sollte der  $A_{260}/A_{280}$ -Quotient Werte zwischen 1,7 und 2,0 besitzen, Kontaminationen durch Proteine und besonders Phenol führen zu deutlich geringeren Quotienten, was eine genaue Konzentrationsbestimmung erschwert.

#### **II.5.1.2 Streumessung**

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

#### **II.5.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde ein Bradford-Assay (1976) durchgeführt. Der Assay wurde in einer 96-well-Flachbodenplatte durchgeführt. Dazu wurde als Standard BSA in einer Verdünnungsreihe (200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) eingesetzt (in 20  $\mu\text{l/well}$ ). Die Probe wurde ebenfalls in einer Verdünnungsreihe mit je 20  $\mu\text{l}$  pro well vorgelegt. Danach wurden zu jedem well 200  $\mu\text{l}$  frisch angesetztes Bradfordreagenz hinzu gegeben. Anschließend wurde sofort die Farbentwicklung mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Konzentration der Proteinlösung konnte mit Hilfe der Standardkurve berechnet werden.

<u>Bradford-Reagenz:</u>	3 ml Bradford-Stammlösung + 17 ml <i>A. dest.</i> (autoklaviert)
<u>Bradford-Stammlösung:</u>	100 mg Coomassie Blue G 50 ml Ethanol 97% 100 ml Phosphorsäure 85%

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

## **II.5.1.4 Aufreinigung von DNA**

### **II.5.1.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Um wässrige Nukleinsäurelösungen von Proteinen zu befreien, wurden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dazu wurde die zu reinigende Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt und mindestens eine Minute sorgfältig gemischt. Die Probe wurde dann zur schnellen Phasentrennung drei Minuten zentrifugiert (13000 x g), der wässrige Überstand wurde ohne Interphase abgenommen und solange extrahiert, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Anschließend wurde die Lösung mit einem Volumen Chloroform extrahiert, um organische Rückstände zu entfernen. Dazu wurde ein Volumen Chloroform zugegeben, gut gemischt und wiederum drei Minuten zentrifugiert (13000 x g). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **II.5.1.4.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren**

Die zu fällenden Lösungen wurden, sofern die Salzkonzentrationen es erforderten, mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und dann mit 2,5 Volumen eiskaltem absoluten Ethanol vermischt und entweder in flüssigem Stickstoff Schockgefroren oder 30 min bei -20°C gefällt. Danach wurden die gefällten Nukleinsäuren 30 min bei 13000 x g, 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter zehnmütigen Zentrifugation bei 13000 x g, 4°C wurde das Pellet luftgetrocknet und in TE-Puffer (pH 8) oder *Aqua dest.* aufgenommen.

## **II.5.2 Enzymatische Reaktionen**

### **II.5.2.1 Restriktionshydrolysen**

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen vom Typ II (Roberts, 1979), bei welchen die Erkennungs- und Spaltungssequenz jeweils identisch ist. Die hydrolytische Spaltung doppelsträngiger DNA

fürte, abhängig von der eingesetzten Restriktionsendonuklease, entweder zu glatten oder zu 3'- bzw. 5'-überhängenden Enden an den entstandenen DNA-Fragmenten. Die hier benutzten Restriktionsenzyme wurden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Probe entweder hitzeinaktiviert oder mit einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert.

Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden anschließend in Agarosegelen analysiert.

#### **II.5.2.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden**

Die 5'-Enden linearisierter Klonierungsvektoren wurden zur Vermeidung der Religation vor dem Einsatz in Ligationsreaktionen durch Behandlung mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Hierzu wurden 100 pmol überhängende 5'-Enden bzw. zwei pmol glatte Enden mit 1 Einheit SAP in 1x SAP-Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung für 20 min bei 80°C gestoppt.

#### **II.5.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

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

#### **II.5.2.4 cDNA-Synthese**

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

#### **II.5.2.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)**

Zur Generierung von DNA-Fragmenten für Vektorstrukturen sowie für die semiquantitative Analyse von cDNA-Proben wurden PCR-Reaktionen in einem Thermocycler durchgeführt.

Standard-Reaktionsansatz:

1-5 µl Template  
5 µl 10x Polymerase-Puffer  
400 µM dNTP-Mix  
1 µM Primer  
2.5 U Polymerase  
Aqua dest. ad 50 µl

Standard-Thermoprofil:

a. 95°C, 5 min  
b. 95°C, 30 s  
c. 62°C, 30-60 s (b-d, 30 Zyklen)  
d. 72°C, 60 sec  
e. 72°C, 7 min

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

**II.5.2.6 DNA-Sequenzierungen**

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

**II.5.3 Isolierung von Nukleinsäuren****II.5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Zur schnellen analytischen Präparation von Plasmid-DNA aus ü.N.-Kulturen wurde der ‚Plasmid DNA Miniprep Kit‘ (Qiagen, Germany) nach Herstellerangaben verwendet. Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem ‚Plasmid DNA Maxiprep Kit‘ (Qiagen, Germany).

**II.5.3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

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

### II.5.3.3 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurden je nach Ausgangsmaterial  $3 \times 10^7$  Toxoplasmen oder  $3 \times 10^6$  eukaryontische Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in 1 ml DNA-Lysepuffer aufgenommen und die Suspension mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K und 20  $\mu\text{g/ml}$  RNase A versetzt. Die Lyse der Proteine und der RNA erfolgte für 16 h bei 50°C im Eppendorfschüttler. Nach der Inkubation wurde die genomische DNA extrahiert und gefällt. Die gefällte genomische DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

DNA-Lysepuffer:     100 mM NaCl  
                          10 mM Tris HCl, pH 8  
                          50 mM EDTA, pH 8  
                          0,5% SDS  
                          20  $\mu\text{g/ml}$  RNase (frisch zugegeben)  
                          0,1 mg/ml Proteinase K (frisch zugegeben)

### II.5.3.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Alle Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) angesetzt.

Gesamt-RNA wurde entweder mit dem „RNA-Preparation“ Kit (Invitrogen, UK) nach Herstellerangaben gewonnen oder durch Lyse der Zellen mittels Guanidinium-Isothiocyant (GSCN) und anschließender Ultrazentrifugation des Lysats auf einem Cäsiumchlorid-Dichtekissen (Sambrook *et al.*, 1989) gewonnen. Die GSCN Methode nutzt die Tatsache aus, dass RNA in Cäsiumchlorid eine höhere Schwebedichte hat als andere Zellbestandteile und deshalb bei der Zentrifugation pelletiert wird, während DNA, Lipide und Proteine im Überstand verbleiben.  $10^9$  zweifach mit PBS gewaschene Toxoplasmen wurden mit 4 ml GSCN-Lösung in einem Greiner Röhrchen lysiert und die Lösung mit 3 ml DEPC-Wasser aufgefüllt. In einem Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) wurden 3 ml des Cäsiumchlorid-Dichtekissens vorgelegt und dieses mit Lysat überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation (Ultrazentrifuge Beckman Optima L60) bei 150000 x g, 23°C für 16 Stunden (Rotor SW41Ti, Beckman). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Röhrchens 2 cm über dem Boden mit einem heißen Skalpell abgeschnitten. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und dann in 50  $\mu\text{l}$  10 mM Tris / DEPC-Wasser, pH 7,5 gelöst. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden photometrisch bestimmt.

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

Die fertige Lösung wurde steril filtriert.

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

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

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

#### **II.5.3.5 Isolation genomischer *GRA9* Sequenzen von *T. gondii* 'Genome walking'**

Die Sequenzinformation der genomischen Sequenzen stromauf- und abwärts des *GRA9*-Lokus wurden durch ‚genome walking‘ isoliert. Es wurde dafür der ‚genome walking‘ Kit von Clontech verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurde 0,5 µg genomische DNA von *Toxoplasma gondii* des Stamms BK verwendet und in jeweils einem Ansatz mit *DraI* bzw. *StuI* vollständig restringiert. Die entstandenen glatten DNA-Fragmente wurden mit dem ‚Genome Walker‘ Adaptor ligiert. Mit dieser Population von genomischen Fragmenten (‚Genome Walker‘ Bibliothek, z.B. *DraI*-, *StuI*-Bibliothek), die beiderseits mit Adaptoren versehen waren, wurde der erste PCR-Schritt durchgeführt (s. Herstellerangaben). Hierbei wurde ein Primer-Paar verwendet, das aus einem Adaptorprimer (AP1) und einem genspezifischen Primer (GSP1) besteht. An diesen ersten PCR-Ansatz schloss sich ein zweite PCR-Ansatz, eine sog. ‚nested‘ PCR (Adaptorprimer: AP2, Genspezifischer Primer: GSP2), an. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel getrennt und isoliert. Die aus dem Agarosegel extrahierten PCR-Fragmente wurden in den Vektor pGEM-Teasy (Promega) subkloniert und sequenziert.

Die klonierten PCR-Fragmenten entsprechen im Plasmid pGEM5'FGRA9 (5'Fragment ist 2kb groß) dem stromaufwärts liegenden Bereich des *GRA9*-Genlokus und im pGEM3'FGRA9 Plasmid (3'Fragment ist 2,4kb groß) dem stromabwärts liegenden Bereich des *GRA9*-Genlokus. Die Sequenzierung konnte nach der kürzlich abgeschlossenen kompletten Sequenzierung des *T. gondii* Genoms auch mit Genbanksequenzdaten bestätigt werden.



## II.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE; (Laemmli, 1970)) benutzt.

Hierbei wird als denaturierendes Agens SDS eingesetzt, welches als amphiphiles Detergenz die native Proteinstruktur auffaltet. Die zu analysierenden Proteine werden aufgrund der denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Proteine werden zunächst in einem Sammelgel fokussiert und dann in einem Trenngel aufgetrennt.

Die Proteinproben wurden zunächst mit 0,2fach SDS-Probenpuffer vermischt und fünf Minuten bei 92°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei einer Spannung von 100 V, bis der Bromphenolblau-Marker die Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung bis zum Ende der Elektrophorese auf 200 V erhöht. Bei Elektrophoresen über Nacht wurde eine konstante Spannung von 40 V angelegt. Die Elektrophorese von Minigelen wurde mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt.

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

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

Lösung C: 10% (w/v) SDS in H<sub>2</sub>O

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

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

Sammelgellösung: 100 ml Lösung A  
250 ml Lösung D  
10 ml Lösung C  
650 ml H<sub>2</sub>O

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

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

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

Das gegossene Trenngel wurde mit n-Butanol überschichtet, um eine gleichmäßige Lauffront zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol abgenommen, das Sammelgel darüber gegossen und mit einem Kamm die Probenkanäle ausgespart.

Sammelgel:                    10 ml Sammelgellösung  
                                      + 100  $\mu$ l 10% APS  
                                      + 10  $\mu$ l TEMED

Die Detektion der Banden erfolgte durch Coomassie-Färbung.

## II.7 Proteinanalysen

### II.7.1 *In vitro* Induktion von „excreted-secreted-antigens“(ESA)

Die Induktion von ESAs in *T. gondii* erfolgte nach der von Darcy entwickelten Methode (Darcy et al, 1988). Dafür wurden  $1,5 \times 10^8$  Tachyzoiten geerntet und in 1,5 ml RPMI 1640 (supplementiert mit 10% FCS) aufgenommen. Es folgte eine Inkubation von 3 Stunden bei 37°C. Die Toxoplasmen werden dann durch eine 10-minutige Zentrifugation bei 2200 x g pelletiert. Der ESA-haltige Überstand wurde durch eine 0,22 $\mu$ m Milliporemembran filtrieren und mit 100 U/ml Aprotinin oder mit 1x Proteaseblockercocktail versetzt und bei -70°C aufgehoben.

### II.7.2 Aufbrechen von Zellen durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen

Für die Präparation von *Toxoplasma*-Lysat wurden Tachyzoiten ( $1-5 \times 10^9$ ) verschiedener Isolate verwendet. Sie wurden nach dem Ernten zweimal in PBS gewaschen, abzentrifugiert (15 min, 600 x g, 4°C), pelletiert und bis zur Aufarbeitung bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Sedimente wurden nach dem Auftauen in *Aqua dest.* vereinigt und auf  $10^9$  Toxoplasmen/ml eingestellt. Diese Suspension wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad wieder aufgetaut. Um große Membrantrümmer und nicht aufgeschlossene Toxoplasmen abzutrennen, wurde das Lysat einmal bei  $4^\circ\text{C}$  für 10 min mit 600 x g zentrifugiert und der Überstand nochmals für 15 min mit 10000 x g bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Dieser Überstand wird im Folgenden als TLA bezeichnet und enthält primär die löslichen Proteine von *T. gondii* Tachyzoiten. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das TLA aliquotiert bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### II.7.3 Aufschließen von Zellen durch Ultraschall

Eine Möglichkeit, Zellen mechanisch aufzubrechen, ist die Sonifizierung. Die Pellets (Tachyzoiten oder HFF-Zellen) wurden nach dem Waschschrift in zwei Hälften geteilt und in kaltem proteaseinhibitoren-haltigen PBS bzw. PBS/0,2 % Triton X-100 (um den Aufbruch der Zellen sicherzustellen) aufgenommen und anschließend im Eisbad mit Ultraschall behandelt (Sonifikation). Es wurde bei Stufe 6 für 75 Sekunden, 30 % *pulse*, sonifiziert. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 13000 x g,  $4^\circ\text{C}$ , für 15 min an. Die Proteintrennung erfolgte im 12% SDS-PAGE.

### II.7.4 Zellfraktionierung extrazellulärer Toxoplasmen und Triton X-114 Partitionierung

Für die mechanische Gewinnung von *Toxoplasma*-lysate wurden frisch geerntete, über eine 3  $\mu\text{m}$ -Membran filtrierte Tachyzoiten ( $1-5 \times 10^9$ ) verwendet. Die Parasiten wurden für 15 min 3000 x g bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500  $\mu\text{l}$  Proteaseinhibitor-cocktail(2x)-EGTA(10mM)-haltigem PBS resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  10% Triton-X-114 (verdünnt in PBS) und eine einstündige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde dann 10 min, 13000 x g bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das daraus entstandene Pellet, die sog. „insoluble fraction“, wurde zweimal mit PBS gewaschen. Der Überstand dagegen wurde für 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und danach für 10 min bei 13000 x g bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Es entsteht dann eine wässrige und eine Detergenzphase. Die Detergenzphase wurde anschließend noch dreimal mit PBS und die wässrige Phase dreimal mit 10% Triton X-114

extrahiert und jeweils durch Zentrifugation für zehn Minuten, RT, 14000 x g partitioniert. Die beiden Phasen wurden danach mit zwei Volumen eiskaltem Aceton über Nacht bei -20°C gefällt und das Präzipitat für 15 min bei 14000 x g, 4°C abzentrifugiert. Danach wurden die Proben in 70%tigem Äthanol gewaschen und luftgetrocknet. Alle Fraktionen wurden dann in PBS aufgenommen und im 12%SDS-PAGE analysiert.

### **II.7.5 Zellfraktionierung intrazellulärer Toxoplasmen und Behandlung von membranassoziierten Proteinen**

Um die biochemischen Eigenschaften von Proteinen in der PV analysieren zu können, wurden Übernachtskulturen von Toxoplasmen-infizierten HFF-Zellen mechanisch mittels eines Zellschabers von Kulturreisflaschen abgeschabt. Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 4-16 Tachyzoiten in der PV nachweisbar. Die Zellsuspension wurde in einem mit Proteasen Inhibitoren („proteases inhibitors cocktail“, Roche Diagnostics GmbH) und EGTA versetzten PBS aufgenommen und durch eine 27-gauge Kanüle gepresst um die Toxoplasmen aus den Zellen freizusetzen. Nach der Abtrennung von noch intakten Parasiten und Zellbruchstücken durch Zentrifugation (2500 x g, 10 min), wurden die verbliebenen Komponenten durch eine Ultrazentrifugation (100000 x g, 1 Stunden, 4°C) in einer „high speed supernatant“ Fraktion (HSS) und in einer „high speed pellet“ Fraktion (HSP) weiter partitioniert. Die Bindung von Proteinen an Strukturen innerhalb der PV, wurde wie bereits von Sibley und Mercier beschrieben (Sibley *et al.*, 1995f; Mercier *et al.*, 2002c) untersucht, indem die HSP Fraktion für 30min auf Eis mit verschiedenen denaturierenden Agenzien (1% NP40, 6M Harnstoff, 0,5M KCl oder 0.1M Natrium Carbonat) behandelt wurde. Es folgte dann eine 1-stündige Ultrazentrifugation bei 100000 x g, 4°C. Die dadurch extrahierten Proteine werden mittels Aceton oder 10% Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert.

### **II.7.6 Immunpräzipitation mit immobilisiertem Protein G**

Mittels Immunpräzipitation (IP) kann ein bestimmtes Antigen aus einer Vielzahl von Antigenen eines Lysats isoliert werden.

Wegen ihrer bivalenten Natur präzipitieren polyklonale Antikörper ihr Antigen bei einem optimalen Antikörper/Antigen-Verhältnis. Das Präzipitat bildet ein Netz, das neben Antigen und Antikörper noch eine Vielzahl anderer Proteine mitreißt. Üblich ist es daher, der Antigenlösung Antikörper im Überschuss zuzusetzen, so dass sich kein Präzipitat bilden kann. Die entstandenen Antigen-Antikörperkomplexe und die freien Antikörper werden

anschließend mit Protein-A- oder -G-Sepharose ausgefällt. Manche monoklonale Antikörper binden schlecht an Protein A, daher wurde in dieser Arbeit nur Protein-G-Sepharose zur Aufreinigung benutzt.

Für die weiterführenden Untersuchungen zur Analyse der Phosphorylierung bzw. der Glykosylierung des GRA9 oder dessen Wechselwirkung mit Membranen / anderen Proteinen durch Protein-Protein-Interaktionen wurde für die Aufreinigung der Proteine das Prinzip der IP verwendet.

Dazu wurde das Lysat (*Toxoplasma*-Lysat oder Parasitophore Vakuol-Lysat) zunächst mit 100µl Protein G-Sepharose (UltraLink™, Pierce) versetzt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses „Precleaning“ dient der Entfernung von Proteinen, die unspezifisch an Protein G-Sepharose binden. Die Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert (13000 x g, 5min, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden dem Lysat 50µl polyklonaler GRA9-Antikörper zugegeben, gefolgt von einer Inkubation auf dem Drehrad (4°C, 8-16h). Nach Zusatz von 100µl Protein G-Sepharose folgte eine weitere Inkubation für 8-16h bei 4°C oder für 2h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Sepharose mit den daran gebundenen Immunkomplexen abzentrifugiert (13000 x g, 5min 4°C), dreimal mit IP-Lysepuffer gewaschen (die genaue Zusammensetzung des Lysepuffers wurde auf dem Versuchstyp eingestellt und ist dort angegeben) und in 50µl Protein-Probenpuffer aufgenommen. Nach Erhitzen der Probe auf 95°C für 5min wurde die Sepharose nochmals abzentrifugiert (13000rpm, 2min) und der Überstand auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

#### **II.7.6.1 Metabolische Markierung von *T. gondii* mit radioaktivem [<sup>32</sup>P]-orthophosphat**

Im phosphatfreiem Medium, wurden HFF-Zellen mit Tachyzoiten (50fach) infiziert und für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die extrazellulär verbliebenen Tachyzoiten wurden mit PBS weggespült. Es folgte dann die Zugabe eines <sup>32</sup>P-orthophosphat (0,1 mCi/ml) haltigen Mediums. Nach einer Inkubation von 16-20 Stunden bei 37°C, wurden die Tachyzoiten-infizierten HFF 1-3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurde 1ml Lyse-Puffer (150mM NaCl, 1%NP40, 0,5%DOC, 0,1%SDS, 50mM Tris/HCl pH8, 2fach konzentrierter Protease-Inhibitor-Cocktail) zugegeben und die Tachyzoiten-infizierten HFF mechanisch mittels eines Zellschabers vom Kulturflaschenboden gelöst. Es folgte dann eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Das Zelllysat wurde dann 10min bei 10000 x g kalt abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C aufbewahrt oder direkt für Immunpräzipitationsversuche (Standard IP-Puffer: 50mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, 2fach konzentrierter

Protease-Inhibitor-Cocktail) eingesetzt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mittels Phosphor-Imager (Image Analyzer FLA-300, Fujifilm).

### II.7.6.2 Glykoprotein-Detektion

Die Glykosylierung eines Proteins dient unter anderem als Signal für den intrazellulären Transport: Glykosylierte Proteine werden ins extrazelluläre Medium bzw. an die Zellmembran transportiert. Außerdem können glykolysierte Proteine als Rezeptoren fungieren.

Um experimentell zu überprüfen, ob GRA9 in *T. gondii* glykolysiert vorliegt, wurde GRA9 aus TLA ( $2 \times 10^9$  Tachyzoiten) immunpräzipitiert und mittels des „GelCode Glycoprotein Staining“ Kits (Pierce Biotechnology) weiter bearbeitet.

Dafür wurden etwa 0,9mg immunpräzipitierter Proteine pro Spur in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Die Nitrozellulosemembran wurde, nach Angaben des Herstellers, zweimal für 10min mit 3% Essigsäure gewaschen. Die Membran wurde für 15min in die „oxidizing solution“ des Testkits überführt, gefolgt von einem 2x5-minütigen Waschschrift mit 3% Essigsäure. Es schloss sich eine 15-minütige Inkubation der Membran mit dem „GelCode“ Glykoprotein Detektionsreagenz, gefolgt von einer weiteren 5-minütigen Inkubation mit der reduzierenden Lösung des Testkits an.

Die Membran wurde danach mit 3% Essigsäure solange gewaschen bis die Glykoprotein-Banden zu sehen waren. Die Membran wurde dann mit *aqua dest* gespült und anschließend in 3% Essigsäure aufbewahrt.

### II.7.6.3 Protein-Protein-Interaktionsuntersuchung

Um die Interaktion von GRA9 mit anderen GRA Proteinen in der PV zu untersuchen, mussten mögliche Komplexe von GRA9 mit anderen Proteinen gewonnen werden. Dazu wurden Tachyzoiten-infizierte HFF-Zellen 24-Stunden nach Infektion mit PBS- $\text{Ca}^{2+}$  gewaschen. Die Zellen wurden dann mechanisch mittels Zellschaber vom Kulturflaschenboden gelöst und in 1 ml modifiziertem IP-Puffer aufgenommen. Die Zellmischung wurde dann drei mal durch eine 27-gauge Kanüle gepresst und anschließend durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 600 x g in einen Tachyzoiten-haltigen Überstand und in ein membranöses Pellet getrennt. Der Tachyzoiten-haltige Überstand wurde erneut bei 3200 x g abzentrifugiert und damit die Tachyzoiten pelletiert. Der dabei entstandene

Überstand wurde mit dem aus der 600 x g -Zentrifugation gewonnenen membranösen Pellet vermischt und 30 min aus Eis inkubiert. Es folgen zwei 30 sekundige Ultraschall-Behandlungen im Eisbad, bei Stufe 6 , 30 % *pulse* (Sonifikator, Cuphorn). Der gesamt Ansatz wurde dann bei 13000 x g zentrifugiert und der daraus resultierende Überstand mit 2x Volumen Aceton versetzt und 2 Stunden bei -20°C inkubiert. Die somit gefällten Proteine wurden in 200µl modifiziertem IP-Puffer (50mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 2fach konzentrierter Protease-Inhibitor-Cocktail) resuspendiert, anschließend immunpräzipitiert und in 50µl 2x Protein-Probenpuffer aufgenommen.

Nach Erhitzen auf 95°C für 5min wurde die Sepharose nochmals abzentrifugiert (13000 x g, 2min) und der Überstand auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, und mittels Antikörpern detektiert.

## II.7.6 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

### II.7.6.1 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE erfolgte mit dem Farbstoff ‚Coomassie Brilliant Blue R250‘. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese in Coomassie-Färbelösung etwa eine halbe Stunde unter leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler gefärbt und anschließend in Entfärberlösung für drei bis 24 Stunden entfärbt. Dabei werden Proteine als dunkelblau gefärbte Banden oder Spots vor dem hellblauen Hintergrund detektiert.

Coomassie-Färbelösung:     50% (v/v) Ethanol  
                                  7,5% (v/v) Essigsäure  
                                  0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärberlösung:         7,5% (v/v) Essigsäure  
                                  20% (v/v) Ethanol

Die so gefärbten Gele wurden in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

### II.7.6.2 Elektrotransfer von Proteinen und Western Blot

Zur Identifizierung von Proteinen nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine in einem ‚Semi-Dry-Blot‘ ( ‚CarboGlas‘, Schleicher & Schüll, Dassel) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Drei Lagen in Kathodenpuffer getränkte ‚Whatman 3 MM‘-Papierstücke, die der Größe des Gels entsprachen, wurden auf die

Kathodenplatte gelegt. Darüber wurde das in Kathodenpuffer getränkte Gel und darauf die mit Anodenpuffer I befeuchtete Membran gelegt. Es folgten wieder drei Filterpapiere, die in Anodenpuffer I angefeuchtet wurden. Als Abschluss dienten drei Filterpapiere, die in Anodenpuffer II getränkt wurden. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche. Die Transferdauer richtet sich nach der Proteingröße und dauerte ca. 30 bis 60 Minuten.

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

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

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

Nach dem Elektrotransfer der Proteine wurde die Membran zunächst zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindestellen mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Blocklösung (5% fettfreies Milchpulver in PBS) unter leichtem Schütteln inkubiert. Primäre- und Peroxidase-gekoppelte Sekundäntikörper wurden in Blocklösung verdünnt und für jeweils mindestens eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert. Im Anschluss an jede Inkubation wurde die Membran zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Zur Entwicklung wurde das Chemilumineszenz-Substrat ‚Super Signal‘ (Pierce) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Lumineszenz wurde mit Röntgenfilmen (Kodak) detektiert. Dazu wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt und in einer Expositionskassette für eine Sekunde bis maximal eine halbe Stunde exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einer Entwicklerlösung (Kodak) für eine bis fünf Minuten. Der Entwicklungsprozess wurde nach kurzem Wässern in einem Fixierbad (Kodak) gleichzeitig gestoppt und fixiert. Abschließend wurden die Filme mit *A. dest.* gewässert und getrocknet. Nach der Digitalisierung mit einem Duchlichtscanner (Epson GT-9600) erfolgte falls nötig eine Quantifizierung mit dem Softwareprogramm ScionImage (Scion Corp., USA).

#### **II.7.6.4 ‚Enzyme linked immunosorbent assay‘ (ELISA)**

Die ELISA-Methode wurde benutzt um das von Eurogentec produzierte Anti-B10-Antiserum quantitativ zu analysieren. Dazu wurde Toxoplasmen-Lysat Antigen (5µg/well) in einer 96 Well Flachbodenplatte angelagert. Danach wurden die potentiell unspezifischen

Bindungsstellen auf der Platte abgesättigt (Milchpulverlösung in PBS). Anschließend wurde das anti B10-Antiserum in Serienverdünnung auf die Platten aufgetragen und die Platten für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die ungebundenen Antikörper herausgewaschen. Nach fünfmaligem Waschen der Mikrotiterplatte wurde der Ansatz mit einem biotinylierten Sekundärantikörper in 1% (w/v) BSA in PBS für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Erneut wurde fünfmal gewaschen und anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min (37°C) mit Streptavidin-Peroxidase in 1% (w/v) BSA in PBS. Nach dem letzten Waschgang wurde durch Zugabe des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Sigma) eine blaue Farbentwicklung bei Raumtemperatur beobachtet. Diese Reaktion wurde mit der 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt, sobald sich der Leerwert verfärbte. Die Produktmenge wurde über die Extinktion bei 450 nm im Photometer (Rainbow, Tecan) quantifiziert.

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

## **II.8 Untersuchungen mittels Mikroskop**

### **II.8.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse**

Durch die Fixierung von Zellen und anschließendem Permeabilisieren sowie Inkubation mit Antikörpern gegen ein bestimmtes Protein kann die Lokalisierung bzw. Expression desselben sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Verfahren der direkten bzw. der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann der Fluoreszenzfarbstoff durch Licht der richtigen Wellenlänge angeregt und sichtbar gemacht werden. Intrazelluläre Parasiten, die für mindestens 24 h in einer konfluenten, auf Deckgläsern hochgezogenen HFF-Kultur gewachsen waren, wurden in PBS gewaschen (dieser und alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt). Es folgte die Fixierung der Zellen mit PBS/4% Paraformaldehyd für 20 min mit einer anschließend dreiminütigen Inkubation in PBS/0,1M Glycin, um die Fixierung zu neutralisieren. An den Fixierungsschritt schloss sich ein 20-minütiger Permeabilisierungsschritt, je nach Bedarf, mit PBS/0,2 % Triton X-100 oder mit PBS/0,002% Saponin an. Dann folgte ein 20-minütiger Blockierungsschritt mit PBS/0,1 % Triton X-100/2 % BSA oder PBS/0,002 % Saponin/2%BSA (statt BSA wurde in einigen Experimenten 2% normales Ziege-Serum verwendet), gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation mit dem/den relevanten Antikörper/n, adäquat verdünnt in Blockierungslösung. Nach 3 x 5 min Waschen mit Waschlösung (Permeabilisierungslösung) folgte die Inkubation mit dem/den sekundären, fluoreszenzgekoppelten, 1:100-1:200 verdünnten Antikörper/n für 45 min bis 1 h. Wiederum

folgten 3 Waschschr tte zu jeweils 5 Minuten, anschließend wurden die Zellen in einigen Experimenten mit DAPI gefärbt (0,1 mg/ml DAPI/PBS, interkaliert in die DNA), nochmals mit PBS gewaschen und auf Objektträger mit Einbettmedium (z.B. Fluoromont G) eingebettet. In Kartonmappen wurden die Präparate bei 4°C im Dunkeln bis zur Analyse aufbewahrt.

### II.8.2 Kryo-Elektronenmikroskopische Detektion

Die in dieser Arbeit gezeigten elektronenmikroskopischen Analysen wurden im Labor von J-F. Dubremetz (Montpellier, Frankreich) durchgeführt.

Die Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen, wurden mit 4% Paraformaldehyd, 0,05% Glutaraldehyd in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer für 90 min fixiert. Es folgte ein Waschschr tt in PBS-10%FCS (PBSFCS) und eine Infusion in 10% Polyvinylpyrrolidone haltiger Sucrose (2,3M) und Einfrierung in flüssigem Stickstoff. Schnitte wurden bei -100°C mittels eines „Leica Ultracut“ durchgeführt. Die Schnitte wurden mit anti-GRA9-Serum (1:40 in PBSFCS) 1 Stunde inkubiert und dreimal (je 5min) mit PBS gewaschen. Es folgte eine 20-30minutige Inkubation mit Ziege anti-Kaninchen Serum (1:200 in PBSFCS) und ein dreimaliger Waschschr tt (je 5min). Danach wurden die Schnitte mit goldmarkiertem (10nm Partikel) Protein-A (in PBS verdünnt, 0,05 OD525nm) inkubiert und anschließend in Methycellulose (2%)-Uranyl Acetat (0,4%) eingebettet. Die Analyse wurde mit einem JEOL 1200EX II Elektronenmikroskop durchgeführt (Sibley et al., 1995).

### II.9 Erzeugung von *Toxoplasma gondii* Mutanten

Für die Generierung der GRA9-ko-Mutante sowie der GRA9- bzw. LDH1-überexprimierenden Mutanten war es nötig, *T. gondii* genetisch zu manipulieren und diese stabilen Mutanten zu klonieren.

Als Vektoren für die *Toxoplasma*-Tranfektion wurden als Plasmide pKS-Derivate (Stratagene) eingesetzt.

#### II.9.1 Überexpression von Proteinen in *T. gondii*

Für die Erzeugung der GRA9-überexprimierenden Mutanten wurden in den Vektor pTub+Myc (freundliche Gabe von Boris Striepen, Athens, USA) zusätzlich die cDNA für GRA9 bzw. LDH1 unter der Kontrolle des  $\beta$ -Tubulin-Promotors eingefügt. An beide cDNA Sequenzen wurde außerdem vor dem Stop-Codon noch die Sequenz für das myc-Epitop als

,tag' angefügt. Dazu wurden PCR-Fragmente von *T. gondii* cDNA mit den Primern Bgl2G9-mycfor und Avr2G9-mycNSr bzw. Bgl2LDH1for und Avr2LDH1rev amplifiziert, mit *Bgl*III und *Avr*II restringiert und in den *Bgl*III und *Avr*II geschnittenen Vektor ligiert. Die resultierenden Expressionsplasmide für die Expression von GRA9 bzw. LDH1 in *T. gondii* wurden als pGRA9+Myc bzw. pLDH1+Myc bezeichnet.

### **II.9.2 Zielvektor zur Generierung von *GRA9* ‚Knock-out‘ Mutanten: p5'G9ble3'G9**

Für die Erzeugung einer ‚Knock-out‘ Mutante in *T. gondii* ist es essentiell, dass der Zielvektor 5'- und 3'-seitig vom Selektionsmarker mit ausreichend langen genomischen Fragmenten versehen ist, da in *Toxoplasma gondii* nur unter dieser Voraussetzung mit einer erfolgreichen homologen Rekombination zu rechnen ist (Roos *et al.*, 1994).

Die homologen genomischen Sequenzen zum Zielgen im Targetvektor erhöhen die Wahrscheinlichkeit für homologe Rekombinationsereignisse am Zielgenloкус. Aus diesem Grund wurden zur Generierung des Zielvektors für den *GRA9*, ‚Knock-out‘ die in (5.3.5) gefundenen genomischen Sequenzdaten verwendet. Mit dem Plasmid pGEM5'FGRA9 und den Primerpaar KpnI-NK-Fla5for und Nsi-NK-Fla5rev wurden die 1,8 kb der 5' stromaufwärts liegenden *GRA9* genomischen Sequenz generiert, mit *Kpn*I und *Nsi* restringiert und in den ebenso geschnittenen Vektor pTubble3'SAG (freundliche Gabe von Corinne Mercier, Grenoble, Frankreich) ligiert. Das resultierende Plasmid (pGRA9KO-5'F) diente nun als Empfänger der 3' flankierenden Region des *GRA9*-Gens. Als letzter Schritt wurde nun ein 2,3 kb großes PCR-Fragment aus dem Plasmid pGEM3'FGRA9 mittels des Primerpaares PacI-NK-Fla3for und SacI-NK-Fla3rev amplifiziert und mit *Pac*I und *Sac*I geschnitten. Dieses PCR-Fragment wurde in den ebenso geschnittenen Vektor pGRA9KO-5'F ligiert, so dass das Bleo-Gen (Bleomycin-Gen als Selektionsmarker) im Zielvektor von 1,8 kb stromaufwärts und 2,3 kb stromabwärts zum *GRA9*-Genloкус liegenden genomischen Sequenzen flankiert wurde.

### **II.9.3 Transfektion von *Toxoplasma gondii***

Für die Transfektion von *T. gondii* ist die Elektroporation die gängigste Methode (Roos *et al.*, 1994). Hierzu wurden 10 bis 100 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA gefällt und in 100 µl Cytomix aufgenommen. Frische extrazelluläre Toxoplasmen wurden geerntet und durch einen sterilen 3 µm Filter (Millipore) filtriert, um Wirtszellen abzutrennen. Die gefilterten Toxoplasmen wurden für 20 min bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert und in Cytomix aufgenommen (1 x 10<sup>8</sup> Toxoplasmen/ml). Für die Elektroporation wurden die gelöste DNA

und 300 µl der Toxoplasmen in eine 0,4 cm Elektroporationsküvette (Biorad) überführt. Schließlich wurden die Parasiten mit einem 2000 V Puls bei 25 µF elektroporiert (Genepulser II, Biorad). Nach der Elektroporation wurde die Küvette bei RT für 15 min inkubiert und die Parasiten in eine konfluente 25 cm<sup>2</sup> Flasche mit HFF überführt und bei 37°C inkubiert .

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

#### **II.9.4 Isolierung stabiler *T. gondii*-Transfektanten**

Für die Isolierung stabiler *Toxoplasma gondii*-Transfektanten wurden die elektroporierten Parasiten 48 Stunden nach der Infektion von HFF-Zellen geerntet. Die Parasiten wurden mit PBS gewaschen und in einem mit 50µg/ml Phleomycin (einem Bleomycin-Analogen) supplementierten Kulturmedium (Serum frei DMEM, 10mM HEPES) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Parasiten wurden dann in ein 5 µg/ml Phleomycin haltiges Kulturmedium transferiert mit HFF-Zellen bei 37°C inkubiert. Die mit *Toxoplasma gondii*-Transfektanten infizierten HFF-Zellen wurden dann täglich mikroskopisch beobachtet und sobald ca. 80 bis 90% der Parasiten extrazellulär vorlagen ( ca.5-6 Tage nach der Infektion), wurden 10% des Kulturansatzes in eine neu konfluent bewachsene 25 cm<sup>2</sup> HFF Flasche überführt. Nach ca. zehn bis 14 Tagen unter ständiger Phleomycinselektion wurden die überlebenden Parasiten als resistent beurteilt und wurden dann unter Phleomycinselektion mittels ‚limiting dilution‘ in 96-well-Platten kloniert. Dazu wurden die geernteten Toxoplasmen gezählt und ein Parasit in jedes well gegeben. Nach fünf bis sieben Tagen Inkubation der Klonierungsplatten wurden diese mikroskopisch begutachtet, und die Wells mit nur einem Lysehof im HFF Monolayer wurden als klonale Linien identifiziert. Alle Klone und auch alle unklonierten Linien wurden standardmäßig unter Phleomycingabe kultiviert.

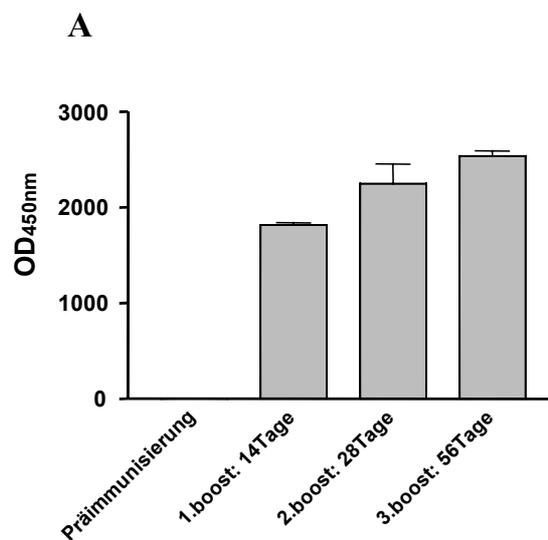
#### **II.10 Sequenzanalyse**

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem DNASTar Programmpaket analysiert (DNASTar, Madison, USA). Homologie-Suchen (blastp- oder tblastn-Algorithmus) wurden auf dem GenBank-Server, der *Toxoplasma gondii* Clustered EST Database sowie der PlasmoDB (*Plasmodium*) durchgeführt.

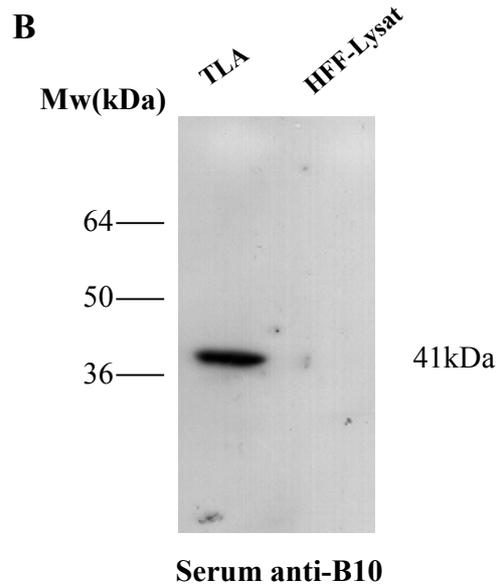
### III. Ergebnisse

#### III.1 Herstellung eines Antiserums gegen das Toxoplasmenantigen B10

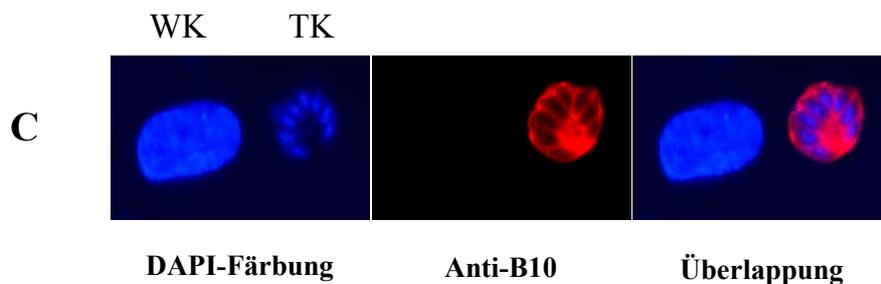
Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde ein Antiserum gegen das Toxoplasmenantigen B10 nach Immunisierung von Kaninchen mit nativem B10 erzeugt (Eurogentec). Das gewonnene Serum reagierte zwar eindeutig mit dem B10 Protein, detektierte aber im Westernblot noch andere Proteine. Für die geplanten Immunfluoreszenzanalysen wurde jedoch ein monospezifisches Antiserum benötigt. Daher wurde das aus den Kaninchen gewonnene Serum mittels Affinitätschromatographie mit rekombinantem B10 aufgereinigt (Eurogentec, Belgien). Die Reaktivität des gereinigten Antiserums mit *Toxoplasma*-Lysat wurde zunächst mittels ELISA untersucht.



**Abb.8: (A): ELISA-Test.** Die Reaktivität des Serums aus den mit B10 immunisierten Kaninchen wurde zu verschiedenen Zeiten während der Immunisierung mittels ELISA überprüft. Abb. 8a zeigt, dass die Reaktivität des Kaninchenserums mit dem Toxoplasmenantigen nach der Immunisierung deutlich ansteigt. In den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegtes TLA (5µg/well) wurde mit an verschiedenen Tagen aus Kaninchen gewonnenem Serum gegen das B10 Protein im ELISA getestet.



**(B): Western-Blot-Analyse.** Das B10 Antiserum detektiert eine solitäre Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich im *Toxoplasma*-Lysat Antigen (TLA). Dies ist eine für Toxoplasmen spezifische Reaktion, denn Proteine die aus den Wirtszellen der Toxoplasmen gewonnen wurden (HFF-Lysat), werden von dem Antiserum nicht erkannt. Für den gezeigten Westen-blot wurden je 5 µg / Spur von den beiden Antigenen in einem 12% SDS-Gel aufgetragen, auf Nitrozellulose transferriert und mit dem Anti B10 Antiserum (1:5000) markiert und mit einem sekundären anti-Kaninchen-Ak (1:5000) detektiert.



**(C): Darstellung von B10 in Toxoplasmen-infizierten Fibroblasten mittels indirekter Immunfluoreszenz.** HFF Zellen wurden für 36 Stunden mit Toxoplasmen infiziert, anschließend fixiert und dann mit DAPI (Zellkernfärbung) bzw. dem B10-Antiserum (1:200) behandelt. Anschließend wurden die gebundenen anti B10-Antikörper mit einem Cy3-gekoppelten Maus Anti-Kaninchen Antikörper (1:100) detektiert.

WK; Wirtszellkern; TK; Toxoplasmenkern

Die Abbildung 8A zeigt, dass das Kanichenserum gegen das *Toxoplasma*-Lysat-Antigengemisch (TLA) gut reagiert.

Anschließend wurde die Spezifität des Serums für das native B10 Protein sowohl im Western-Blot als auch mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse ermittelt:

Im Western-blot detektiert das Serum nur eine Bande mit der erwarteten Größe (41kDa) in der TLA-Spur, während keine Bande in der HFF-Lysat-Spur zu sehen ist (Abbildung 8B).

Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigt, dass das Serum spezifisch mit intrazellulären Toxoplasmen reagiert. Die als Kontrolle durchgeführte DAPI-Färbung, die spezifisch nur DNA färbt, erlaubt die Lokalisierung des Zellkerns der Wirtszelle und der Zellkerne der Toxoplasmen. Im Gegensatz dazu detektiert das B10-Antiserum nur die Toxoplasmen, und reagiert nicht mit Bestandteilen der Wirtszelle (Abbildung 8C).

Insgesamt erwies sich das Kaninchenserum somit als spezifisch für das B10-Protein und ist daher geeignet das Toxoplasmenprotein B10 näher zu charakterisieren.

### **III.2 Lokalisierung des B10 Proteins in *T. gondii***

Um das B10 Protein innerhalb der infizierten Wirtszelle zu lokalisieren, wurden sowohl indirekte Immunfluoreszenz (IFA)- als auch elektronenmikroskopische (EM)-Analysen durchgeführt.

#### **III.2.1 Lokalisierung des B10 Proteins in mit Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen**

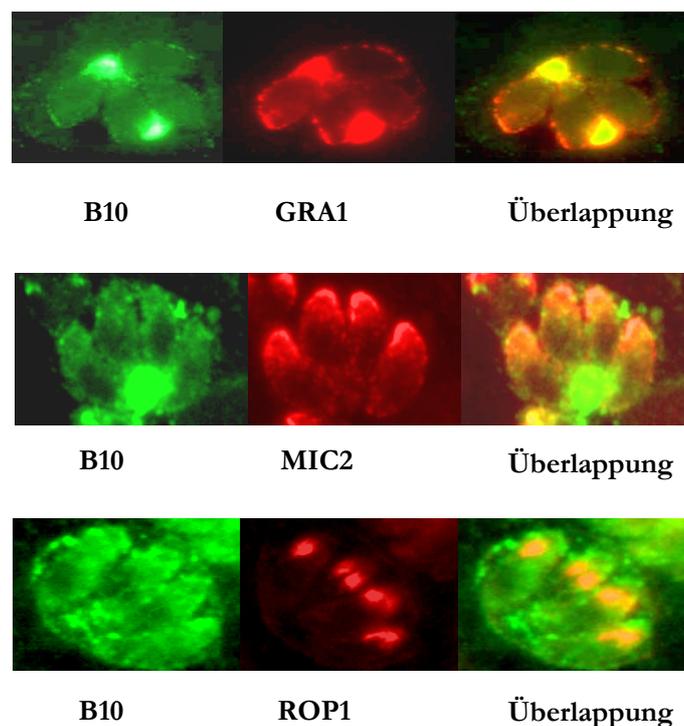
Die Tatsache, dass das B10 Protein zu den sogenannten „excretory-secretory-antigen“ gehört (Nockemann *et al.*, 1998), führte zu der Vermutung, das B10 ein sekretorisches Protein ist. Die typisch sekretorischen Organellen von *T. gondii* sind: i. die Mikronemen, die MIC-Proteine freisetzen, ii. die Rhoptrien, die ROP-Proteine freisetzen und iii. die „dense granules“, die die GRA-Proteine sekretieren. Die wichtigsten bekannten „ESA“ gehören zu den GRA Proteinen.

Um die Lokalisation des B10-Proteins in Toxoplasmen zu untersuchen, wurden HFF-Zellen mit *Toxoplasma*-Tachyzoiten infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden, wurden die Zellen mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert und mit einer 0,2% Triton X-100-haltigen PBS-Lösung permeabilisiert. Durch diese Permeabilisierungsmethode werden die Wirtszellmembran, die parasitophore Membran und die *Toxoplasma*-Membran für Antikörper durchgängig.

Bei den gezeigten Analysen wurden Antikörper gegen die bekannten Toxoplasmenproteine GRA1, MIC2 und ROP1 als Marker der „dense granules“, Mikronemen und Rhoptrien

verwendet. Die doppelte Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Anti-B10 Serum und mit monoklonalen Antikörpern gegen die oben genannten Proteine zeigten eine deutliche Kolokalisierung des B10 Proteins mit dem „dense granules“ Protein GRA1. Eindeutig ist erkennbar, dass das von dem B10 Antiserum detektierte Protein das gleiche Verteilungsmuster innerhalb der parasitophoren Vakuole aufweist wie das GRA1 Protein. Im Gegensatz dazu weisen die anti-MIC2 und anti-ROP1-Antikörper Proteine hauptsächlich innerhalb der Toxoplasmen nach, deren Verteilungsmuster sich von dem des B10 Proteins deutlich unterscheiden (Abbildung 9).

Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass B10 wahrscheinlich ein Mitglied der GRA Proteinfamilie ist.

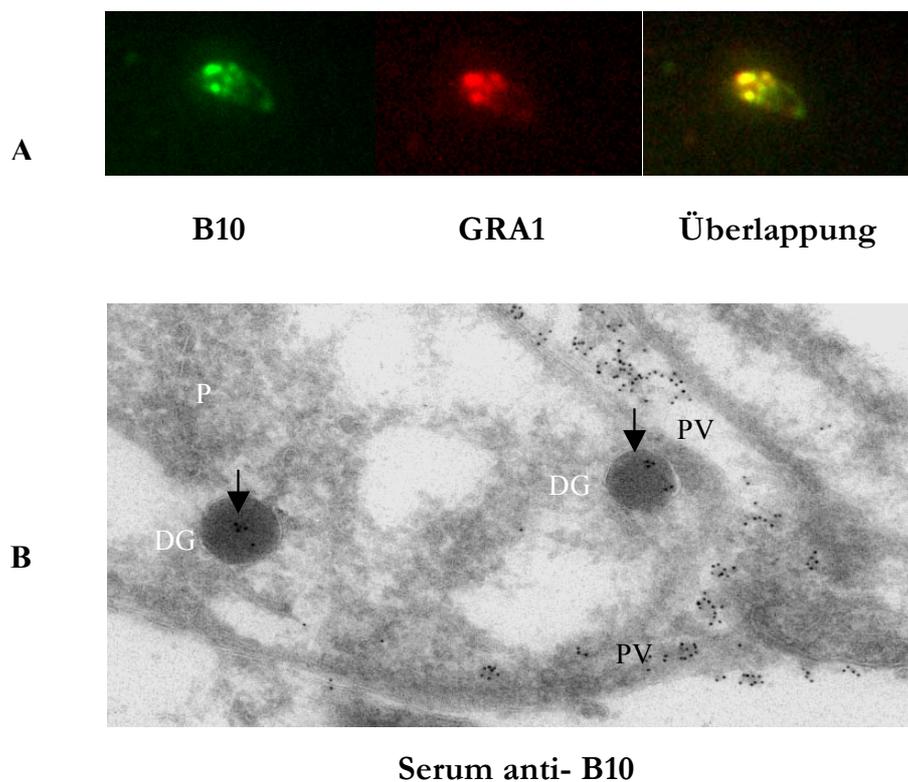


**Abb. 9: Kolokalisation von B10 mit GRA1 in der indirekten Immunfluoreszenz.**

Die doppelte Immunfluoreszenz-Analyse wurde mit RH Toxoplasmen-infizierten HFF-Zellen durchgeführt. Es zeigt sich eine eindeutige Kolokalisation von B10 Protein mit GRA1. Die mit den Antikörpern gegen das MIC2- und ROP1-Protein dargestellten Antigene weisen ein deutlich anderes Verteilungsmuster auf.

### III.2.2 Definition des B10 Proteins als ein neues GRA-Protein: GRA9

Der endgültige Beweis dafür, dass das B10 Protein zu den GRA-Proteinen gehört, ist dessen Darstellung in den DG. Hierfür wurden *Toxoplasma* Tachyzoiten auf Objekt-Träger gebracht und anschließend mit einer 0,2% Triton-X 100/ PBS-Lösung permeabilisiert. Es folgte eine doppelte Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Anti-B10 Serum und dem monoklonalen Anti-GRA1. GRA1 diente als Marker für DG. Die Abbildung 10A stellt das typisch punktförmige Muster der DGs und eine deutliche Kolokalisierung des B10 Proteins mit GRA1 dar.



#### Abb. 10: B10 ist ein GRA-Protein

(A) Doppelte Immunfluoreszenz-Analyse mit extrazellulären Tachyzoiten zeigt eine deutliche Kolokalisierung des B10 Proteins mit GRA1, wobei das typische punktförmige Muster der „dense granules“ zu sehen ist.

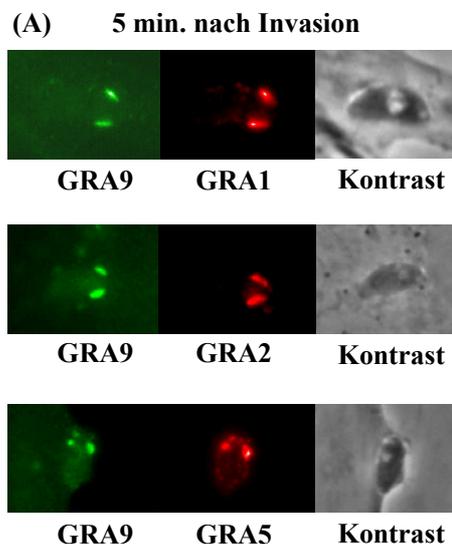
(B) Die Untersuchung im Elektronenmikroskop von Kryosektionen von Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen mit dem Anti-B10 Serum bestätigt die Lokalisierung des B10 Proteins in den DG. Die Pfeile zeigen auf die DG die Goldpartikel enthalten. Hierfür wurden Kryosektionen von Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen mit dem Anti-GRA9 AK inkubiert und anschließend mit einem mit 10 nm Gold Partikeln gekoppelten Anti-Kaninchen IgG (H+L) Serum detektiert. Ferner ist in dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme B10 Protein innerhalb der parasitophoren Vakuole erkennbar, P: Parasit, PV: parasitophore Vakuole.

Kryosektionen von Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen wurden mit dem Anti-B10 Serum inkubiert und anschließend durch Gold-markiertes Anti-Kaninchen-IgG detektiert. Die Abbildung 9B zeigt eindeutig das B10 Protein in den DG. Die Detektion des B10-Proteins in den DG mittels Elektronenmikroskopie (EM) lieferte den endgültigen Beweis dafür, dass B10 Protein ein GRA-Protein ist. Nach der von Sibley (1991) vorgeschlagenen Nomenklatur für GRA-Proteine erhält B10 damit die Bezeichnung GRA9 und von nun an wird nur noch die Bezeichnung GRA9 für das B10 Protein benutzt.

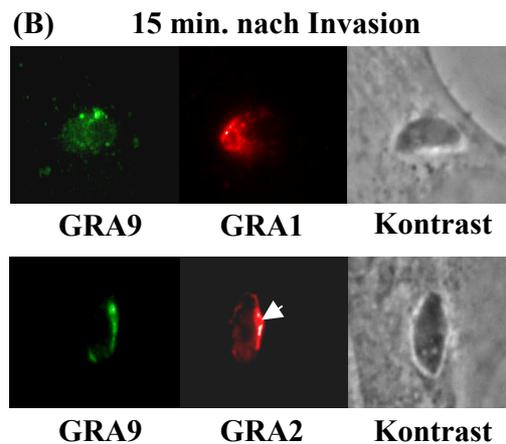
### III.2.3 Sekretion von GRA9: Analyse mittels Immunfluoreszenz

#### III.2.3.1 Sekretionskinetik von GRA9 nach der Invasion der Wirtszelle durch *T. gondii*

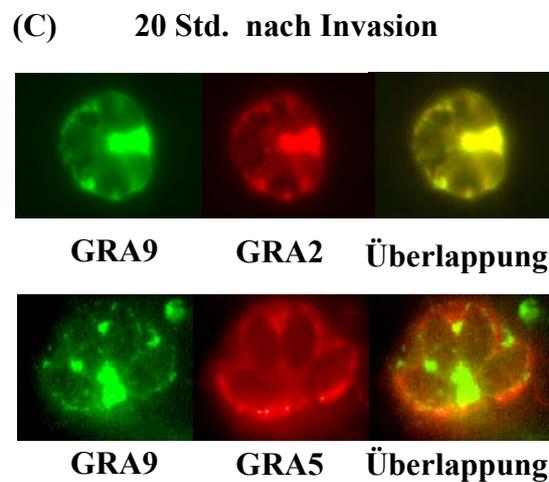
Es wurde gezeigt, dass die GRA-Proteine GRA1, GRA2, GRA4 und GRA6 am apikalen Pol des Parasiten sezerniert werden, dort sehr kurz verweilen und ihre endgültigen Zielorte ca. eine Stunde nach der Bildung der PV erreichen (Sibley *et al.*, 1995; Labruyere *et al.*, 1999; Carruthers & Sibley, 1997).



**Abb. 11 : (A) Doppelte Immunfluoreszenz-Analyse an HFF-Zellen fünf Minuten nach der Infektion mit Tachyzoiten.** Die Abbildung zeigt, dass GRA1, GRA2, GRA5 und GRA9 in den ersten Minuten nach der Bildung der PV sezerniert werden. Die Proteine kolokalisieren zu diesem Zeitpunkt am anterioren Pol der Vakuole.



**(B) 15 Minuten nach der Invasion der Wirtszelle, wird GRA9 als diffuses Signal im Lumen der Vakuole detektiert und kolokalisiert besonders mit GRA1. Im Gegensatz dazu, akkumuliert GRA2 vorübergehend am posterioren Pol oder seitlich und bildet dabei einen Fluoreszenz-Fleck (weißer Pfeil).**



**(C) 20 Stunden nach der Invasion kolokalisiert GRA9 mit GRA2 in der PV. GRA9 kolokalisiert hingegen nicht mit GRA5, das mit der parasitophoren Vakuolenmembran assoziiert ist.**

Um die Sekretionskinetik von GRA9 zu analysieren, wurden HFF-Zellen für 3 Minuten mit Taychzoiten infiziert, kurz gewaschen und für weitere 2 Minuten, 15 Minuten oder 20 Stunden inkubiert. Es folgt dann eine selektive Semipermeabilisierung mit Saponin, wobei nur die Wirtszellmembran und die PVM durchgängig für Antikörper werden.

Die Abbildung 11 A zeigt, dass GRA9 fünf Minuten nach der Invasion mit GRA1, GRA2 und GRA5 kolokalisiert und dabei eine Konzentration der Proteine am apikalen Pol des Parasiten stattfindet. 15 Minuten nach der Invasion ist GRA2 als dominierender Fluoreszenz-Dot am posterioren Pol des Parasiten oder seitlich (weißer Pfeil) konzentriert, während GRA9, sowie GRA1, gleichmäßig im Lumen der PV verteilt sind (Abbildung 11 B). Dieses Verhalten zeigt, dass GRA9 im Gegensatz zu GRA2 nicht über die Invagination am posterioren Pol des Parasiten transportiert wird. Das membranöse Netzwerk innerhalb der parasitophoren Vakuole wird zunächst an der Invagination am posterioren Pol des Parasiten gebildet. Im Gegenteil zu GRA2 und GRA6 ist GRA9 vermutlich nicht an der Stabilisierung des wachsenden Netzwerks beteiligt.

Die Abbildung 11 C zeigt eine deutliche Kolokalisierung von GRA9 mit GRA2 innerhalb der ausgereiften PV, wohingegen GRA5, ein PVM assoziiertes Protein, eine abweichende Verteilung aufweist.

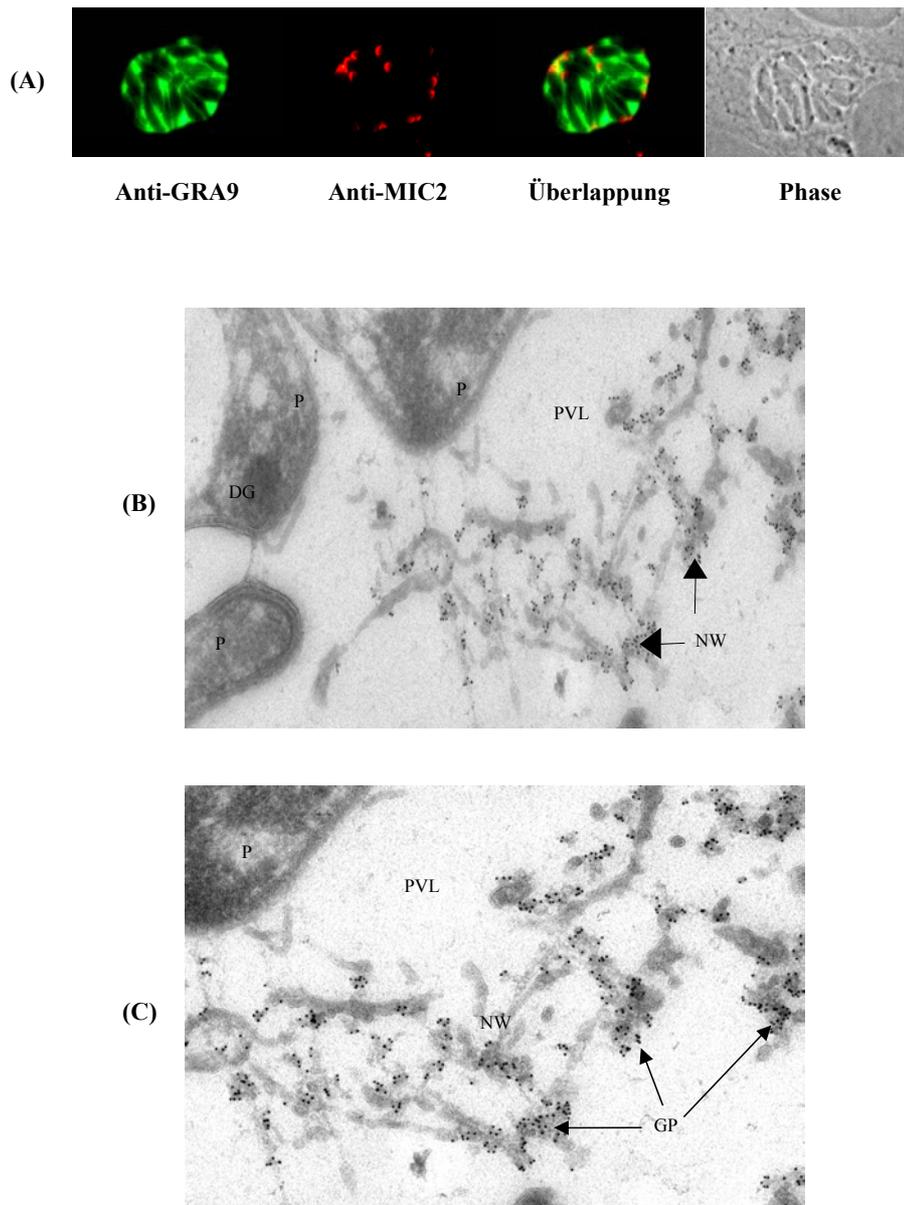
### **III.2.3.2 Im Lumen der PV ist GRA9 mit dem tubulären Netzwerk assoziiert**

Nach der Sekretion in die Vakuole werden die meisten GRA-Proteine mit Membranen assoziiert, entweder mit der PVM (GRA3, 5, 7 und 8) oder mit dem membranösen Netzwerk innerhalb der PV (GRA2, 4 und 6).

In dem folgenden Versuch sollte das GRA9-„targeting“ in der PV untersucht werden.

Die Abbildung 12A zeigt GRA9 im Lumen der PV. Als Kontrolle wurde ein anti-MIC2 Ak benutzt, der nur den apikalen Pol des Parasiten markiert und nicht in der PV zu finden. Eine detaillierte Untersuchung vom GRA9 im Lumen der PV wurde nicht nur durch Immunfluoreszenzanalysen sondern auch mittels Elektronenmikroskopie durchgeführt. Hierfür wurden Kryosektionen von Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen (20h nach der Infektion) mit dem Anti-GRA9 AK inkubiert und anschließend mit einem mit 10 nm Gold Partikel (GP) gekoppelten Anti-Kaninchen IgG (H+L) Serum detektiert (Abbildung 12B und C).

Die Abbildung 12 B/C zeigt eindeutig eine enge Assoziation von GRA9 mit dem Netzwerk in der PV. Auf der Abbildung 12 B ist zu sehen, dass GRA9 in der PV nur am Netzwerk gebunden vorkommt, das Lumen der parasitophoren Vakuole ist frei von GRA9.



**Abb. 12: GRA9 ist mit dem Netzwerk assoziiert**

**(A) GRA 9 findet sich im Bereich der parasitophoren Vakuole.**

20 h nach Infektion mit Toxoplasmen wurde GRA9 mittels Immunfluoreszenz in HFF Zellen detektiert. Die Abbildung A zeigt die Präsenz von GRA9 innerhalb der parasitophoren Vakuole. Im Gegensatz dazu ist das Mikronemenprotein MIC2 nur in den Toxoplasmen und nicht in der PV nachweisbar.

**(B) und (C) Innerhalb der PV ist GRA9 mit dem Netzwerk assoziiert.**

Mittels Elektronenmikroskopie wurde GRA9 im Innern der parasitophoren Vakuole mit immunogoldmarkierten Antikörpern detektiert. Beide Abbildungen zeigen deutlich, dass GRA9 innerhalb der PV mit den tubulären Netzwerkstrukturen assoziiert ist. Lumen der parasitophoren Vakuole, PVL; Parasit, P; Netzwerk, NW; dense granules, DG; Gold Partikel, GP.

### III.2.3.3 Die Innenseite der PVM wird von GRA9 dekoriert

Die parasitophore Vakuole ist von der Parasitophoren-Vakuolen-Membran umgeben (Lingelbach & Joiner, 1998). Die PVM ist frei von integralen Membranproteinen der Wirtszelle (CD44, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase und  $\beta$ 1-Integrin) und wird von den sekretorischen Proteinen von *T. gondii* modifiziert (Sinai *et al.*, 1997).

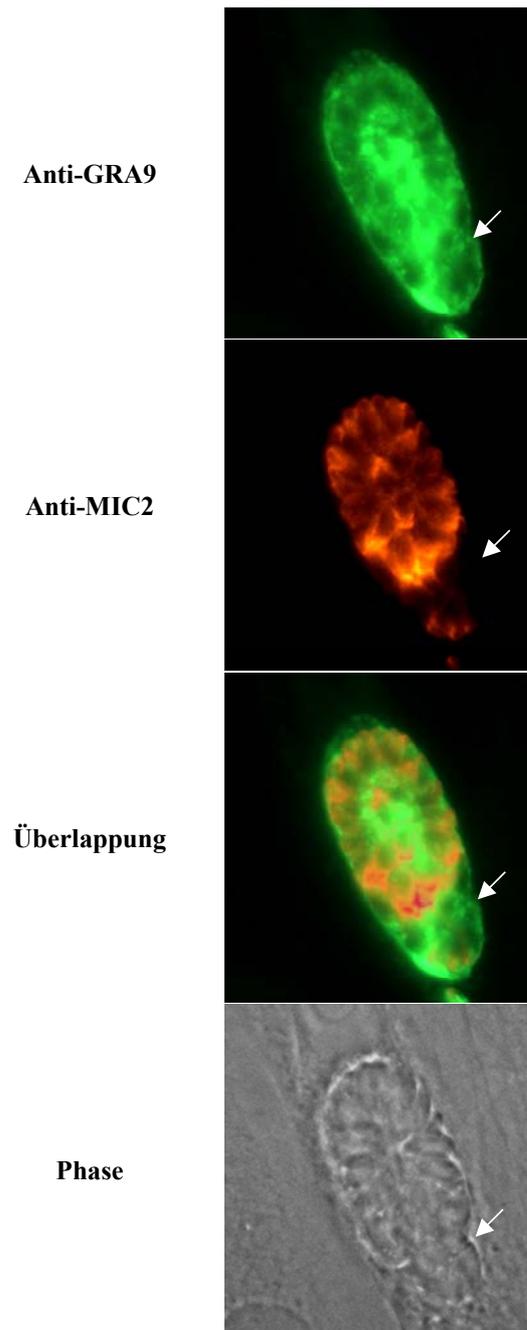
Im folgenden sollte geklärt werden, ob GRA9 mit der PVM interagiert. Dazu wurden HFF-Zellen mit Tachyzoiten für 24-36 Stunden infiziert. Die mit Tachyzoiten infizierten HFF-Zellen wurden dann mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,002% Saponin permeabilisiert. Die Permeabilisierung mit 0,002% Saponin sollte dazu beitragen, dass die Membran der Wirtszelle selektiv für Antikörper zugänglich gemacht wird, während die PVM weitestgehend intakt bleibt.

Die Lokalisierung von GRA9 erfolgt durch Immunfluoreszenz-Analyse, wobei wiederum das Mikronemen-Protein MIC2 als Marker für den apikalen Pol des Parasiten eingesetzt wurde.

Die Abbildung 13 zeigt, dass GRA9 nicht nur in den Spalten zwischen den Parasiten zu finden ist, sondern auch an der Innenseite der PVM nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu ist das MIC2 Protein, wie erwartet, nur am apikalen Pol der Parasiten lokalisiert.

Bei einer völligen Permeabilisierung von Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen mit 0,2% Triton- X100, im Gegensatz zu einer selektiven Permeabilisierung mit 0,002% Saponin, wird außer am apikalen Pol auch eine kleinere Menge von MIC2 entlang des Restes der Plasmamembran von *Toxoplasma* detektiert. Dieses Verhalten bestätigt die Beobachtung, dass MIC2 am apikalen Pol des Parasiten sekretiert, zum posterioren Pol transportiert und erst dort abgespalten wird (Brossier *et al.*, 2003; Huynh *et al.*, 2003). Die Detektion des MIC2 Proteins nur am apikal Pol der Parasiten bestätigt, dass die Integrität der PVM nach der Permeabilisierung mit 0,002% Saponin erhalten bleibt.

Die Lokalisation von GRA9 an der PVM ist ein erster Hinweis für eine mögliche Beteiligung von GRA9 an eventuellen Interaktionen zwischen der Wirtszelle und dem Parasiten. Es ist bekannt dass die PVM durch den sogenannten „PVM-Organell-Assoziation“-Prozess enge Interaktionen mit dem ER und Mitochondrien der Wirtszelle herstellt. Proteine, die an der PVM lokalisiert sind, können daher potentiell an der Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle beteiligt sein.



**Abb. 13: GRA9 interagiert mit der PVM.**

Tachyzoiten-infizierte HFF-Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit 0,002% Saponin permeabilisiert. Die doppelte IFA mit AK gegen GRA9 und MIC2 zeigt, dass die innere Seite der PVM durch GRA9 dekoriert wird. Die weißen Pfeile zeigen die PVM an.

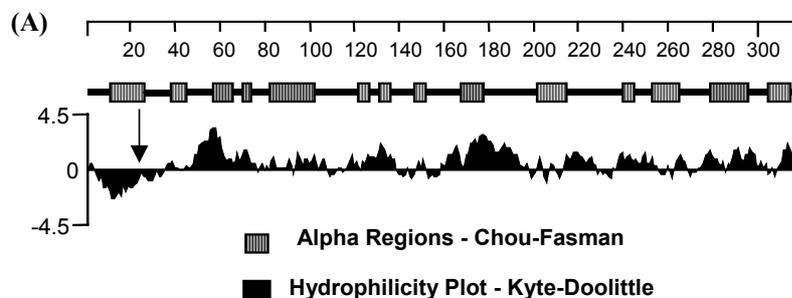
### III.3. Biochemische Charakterisierung von GRA9

#### III.3. 1 Protein-Sequenz-Analyse von GRA9

Wie alle bisher beschriebene GRA-Proteine von *T. gondii* ist GRA9 ein relativ kleines Protein (318 Aminosäuren) mit einer hydrophoben Domäne (19 N-terminale Aminosäuren), die als Signal-Peptid für die Sekretion des Proteins dient. Die komplette Sequenz von GRA9 mit seinen flankierenden Regionen ist von uns in Rahmen dieser Arbeit unter der Acc.No. AY371455 in der EMBL Datenbank veröffentlicht.

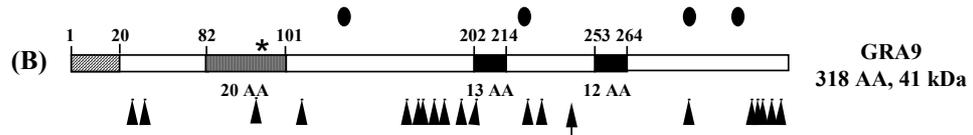
Die Analyse der Sekundärstruktur zeigt einen  $\alpha$ -helikalen Aufbau des reifen Proteins, mit einer amphiphilen  $\alpha$ -Helix von 20 Aminosäuren (82-101) und zwei hydrophoben  $\alpha$ -Helices in Position 202-214 (13 Aminosäuren) und 253-264 (12 Aminosäuren) (Abbildung 14).

Diese hydrophoben Bereiche können nicht als Transmembran-Regionen dienen, da sie dafür zu kurz sind (Abbildung 14A ). Das GRA9 Protein besitzt mehrere putative Stellen für post-translationale Modifizierungen: 20 Phosphorylierungs-, 4 N-Glycosylierungs- und 1 Myristylierungsstelle (Abbildung 14 B).



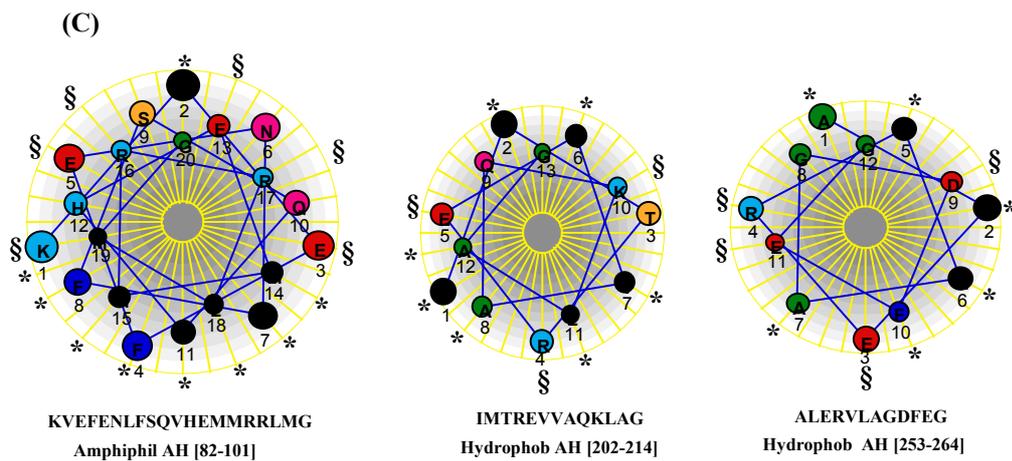
**Abb. 14 : GRA9 ist hauptsächlich hydrophil.**

(A) Das hydrophobe oder hydrophile Profil von GRA9 sowie die sekundären Strukturvorhersagen wurden mit einem auf Kyte-Doolittle- und Chou-Fasman-Methoden basierten Computer-Programm (DNASTAR) ermittelt (Kyte & Doolittle, 1982; Chou & Fasman, 1978). Der Pfeil zeigt die Signal-Peptid-Spaltstelle an. Die meisten hydrophilen Regionen stellen  $\alpha$ -Helix-Konformationen dar.



### (B) Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von GRA9.

Abgesehen von dem Signal-Peptid (19 Aminosäuren) am N-Terminus (Box mit diagonalen Strichen), enthält die Aminosäuresequenz von GRA9 eine amphiphile  $\alpha$ -Helix in Position 82-101 (20 Aminosäuren; graue Box) und zwei hydrophoben  $\alpha$ -Helix in Position 202-214 (13 Aminosäuren) und in Position 253-264 (12 Aminosäuren) (schwarze Boxen). Die vorausgesagten posttranslationalen Modifikationen werden hierbei auch gezeigt: schwarzer Pfeil: Serin /Threonin Phosphorylation; schwarzer Pfeil: Tyrosin Phosphorylierung; Stern: Myristylierung; schwarzer Punkt: N-Glycosylierung).



### (C) Schematische Darstellung der $\alpha$ -Helices (AH).

Die Aminosäuren (AS) 82-101, 202-214 und 253-264 werden als „helical wheels“ dargestellt und zeigen, dass die hydrophoben AS entweder auf der Seite (AH 82-101) oder auf der gesamten Oberfläche der  $\alpha$ -Helix dargestellt werden (AH 202-214 und 253-264).

\* Hydrophobe AS (schwarz, dunkel-blau und grün); § Hydrophile AS (rot, hell-blau, orange).

## III.3.2 Analyse posttranslationaler Modifizierungen des nativen GRA9-Proteins

Fast jedes zelluläre Protein wird nach seiner Synthese am Ribosom noch chemisch verändert. Durch solche Veränderungen können die biologische Aktivität (z.B. Phosphorylierung), die Halbwertszeit oder auch die Lokalisierung des betroffenen Proteins beeinflusst werden. Auf

dem Weg zur Zelloberfläche erfolgen bei vielen Sekret- und Membranproteinen während der Reifung im wesentlichen fünf Modifikationsreaktionen:

- Bildung von Disulfidbindungen
- Herstellung der korrekten Proteinfaltung
- Anheftung und Modifikation von Kohlenhydraten (Glykosylierung)
- Spezifische proteolytische Spaltung
- Zusammenfügung von Proteinuntereinheiten

Die Analyse posttranslationalen Modifikationen des GRA9 Proteins kann Hinweise auf die mögliche biologische Bedeutung des Proteins bei *T. gondii* geben.

### A. Glykosylierung

Wie bereits erwähnt ergab die Computer-Analyse der primären Aminosäuresequenz von GRA9 vier potentielle Glykosylierungsstellen. Um diese Vorhersagen nachprüfen zu können, wurden Immunpräzipitation (IP)-Untersuchungen mit spezifischen GRA9 Ak durchgeführt.

Hierfür wurde *Toxoplasma*-Lysat (von  $2 \times 10^8$  Tachyzoiten) über Nacht entweder mit anti-GRA9 oder anti-GRA2 oder anti-SAG1-Antikörpern inkubiert und die Proteine dann über eine Protein-G Säule gereinigt.

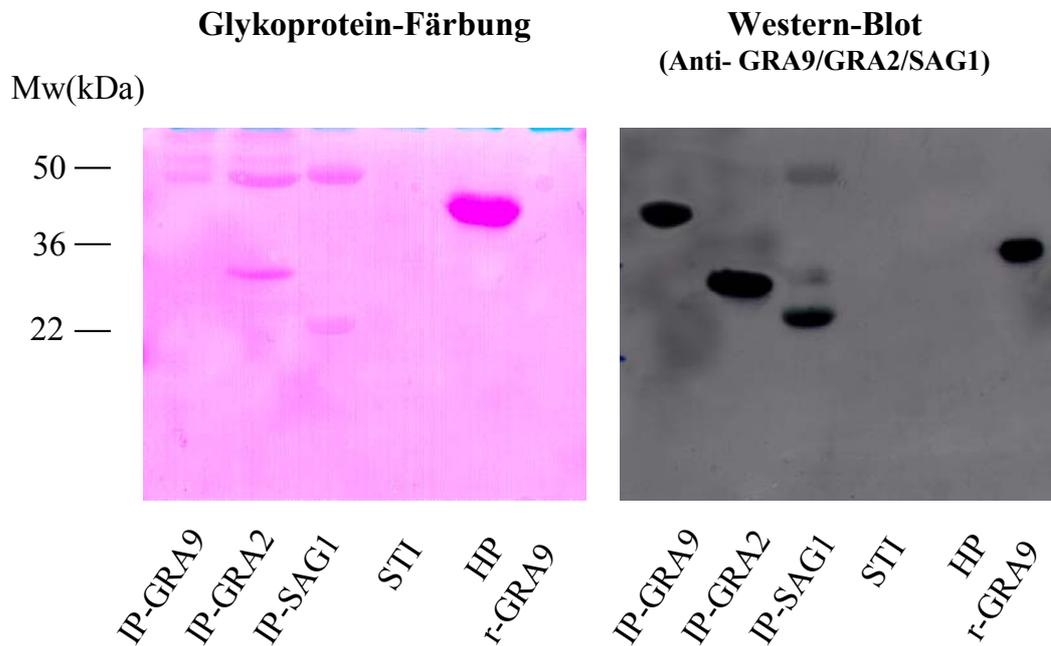
Die Proteine wurden nach Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und danach mittels des „GelCode Glykoprotein Staining Kit“ gefärbt..

Die Abbildung 15 zeigt, dass GRA9 nach der Färbung mit dem Glykoprotein-Detektionsreagenz nicht dargestellt wird, während eine Inkubation dieser Blot-Membran mit dem spezifischen GRA9 Ak die erwartete GRA-9 Bande zeigt.

Die im Kit mitgelieferten Kontrolle-Proteine bestätigen die Gültigkeit dieses Versuchs, wobei die Kohlenhydrat-Anfärbung für HP positiv ist und bei STI negativ bleibt.

Die *Toxoplasma*-Proteine GRA2 (28 kDa) und SAG1 (30 kDa) wurden in diesem Experiment ebenfalls als Kontrollen verwendet und erwartungsgemäß angefärbt. GRA2 ist ein Glykoprotein (Zinecker et al., 1998), das sowohl in der Glykoprotein-Färbung als auch im Western-blot detektiert wird. Das Oberflächenprotein SAG1 ist ein weiteres Glycoprotein (Letourneur et al., 2001) und wird als reifes Protein durch einen GPI-Anker in die Plasmamembran von *Toxoplasma* inseriert (Azzouz et al., 2000). Die Abbildung 15 zeigt, dass SAG1 sowohl in der Glykoprotein-Färbung als auch im Western-Blot detektiert wird, jedoch aber nicht mit dem erwarteten Laufverhalten (Größe von 30 kDa), sondern mit einer Größe von ca. 23 kDa. Die Erklärung dafür ist, dass SAG1 unter denaturierenden

Bedingungen seinen GPI-Anker verliert. Dieser ist ca. 7 kDa groß und SAG1 läuft dann erwartungsgemäß mit einer Größe von 23 kDa im SDS-PAGE.



**Abb. 15: GRA9 ist kein Glykoprotein.**

Nach einer Immunpräzipitation mit den spezifischen Antikörpern gegen GRA9 (IP-GRA9), GRA2 (IP-GRA2) und SAG1 (IP-SAG1), erfolgte eine Glycoprotein-Detektion mit dem „GelCode Glycoprotein Staining Kit“ (Links). Eine Kontrolle auf Anwesenheit von Proteinen wurde nach Inkubation mit Anti-GRA9, Anti-GRA2 und anti-SAG1 im Wester-Blot festgestellt (Rechts). „Horseradish Peroxidase“; HP als positive Kontrolle und „Soybean Trypsin Inhibitor“; SI als negative Kontrolle.

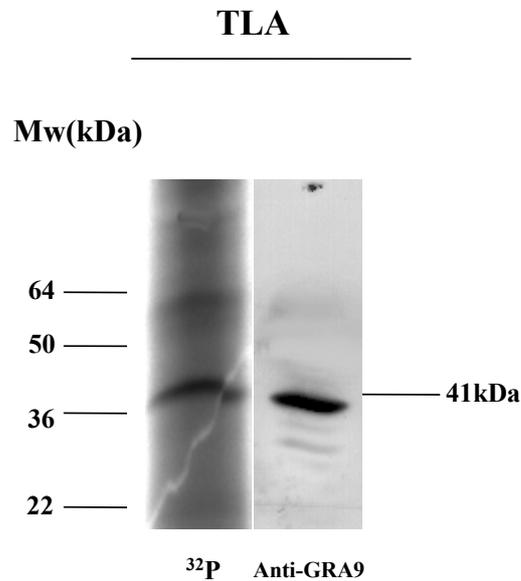
Das rekombinante GRA9 (rGRA9) zeigt, wie erwartet, keine Glykosylierung, da in *E. coli* keine posttranslationalen Modifizierungen an den rekombinanten Proteinen erfolgen. Damit dient das rekombinante GRA9 (rGRA9) hier als eine weitere negative Kontrolle für die Glykosylierung.

Insgesamt erwies sich GRA9 mit der verwendeten Detektionsmethode als nicht glykosyliertes Protein, obwohl dessen primäre Aminosäuresequenz vier Glykosylierungsstellen aufweist.

## B. Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von eukaryotischen Proteinen ist ein wichtiger Punkt in vielen Zellaktivierungsphänomenen.

Um die mit Computer erhaltenen potentiellen Phosphorylierungsstellen von GRA9 zu überprüfen, wurde ein *Toxoplasma*-Lysat ( $4 \times 10^9$  Tachyzoiten mit ( $^{32}\text{P}$ )-Orthophosphat markiert) mit dem spezifischen GRA9 Ak inkubiert. Die Abbildung 16 zeigt die Analyse des erhaltenen Immunpräzipitats nach einer SDS-PAGE, gefolgt von einer Detektion im „Phosphor-Imager“.



**Abb. 16: GRA9 ist ein phosphoryliertes Protein.**

Tachyzoiten-infizierte HFF-Zellen (50:1) wurden 2 Stunden mit ( $^{32}\text{P}$ )-Orthophosphat markiert. Das gewonnene *Toxoplasma*-Lysat (TLA) wurde mit GRA9 Ak inkubiert. Das Immunpräzipitat wurde sowohl im Phosphor-Imager als auch im Western-Blot analysiert. GRA9 wurde in beiden Fällen detektiert.

Es ist eindeutig zu sehen, dass GRA9 (41 kDa) phosphoryliert wird, da die im Phosphor-Imager detektierte Bande mit der im Western Blot korreliert.

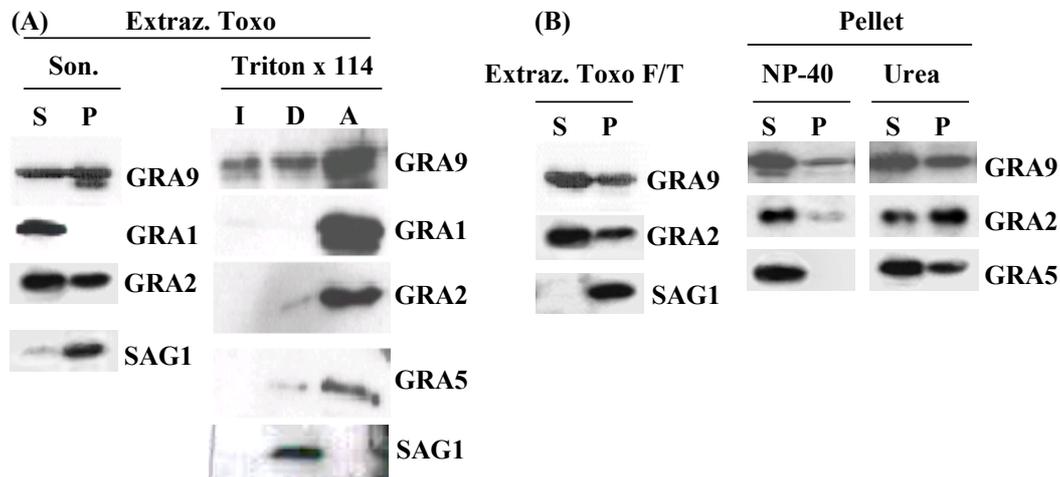
### III.3.3 GRA9 in „dense granules“

Die bisher beschriebenen GRA-Proteine, abgesehen von dem völlig löslichen GRA1, liegen in den DG in zwei Formen vor: eine lösliche und eine aggregatassoziierte Form.

Nach der Sequenz-Analyse mit dem DNASTAR-Programm ist GRA9 bis zu 72% ein lösliches Protein. Um die Löslichkeit des GRA9 in den DG zu untersuchen, wurden extrazelluläre Tachyzoiten durch Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen und dieser Rohextrakt mittels differentieller Zentrifugation und Western-Blot charakterisiert.

GRA9 sowie GRA2 (Mercier *et al.*, 1998), wurden sowohl im „high speed supernatant (S)“ als auch in „high speed pellet (P)“ gefunden. Dies bedeutet, dass die beiden Proteine als lösliche und aggregierte Fraktionen in den DGs vorkommen.

Die Abwesenheit des völlig löslichen GRA1 im Pellet und des Zelloberflächenassoziierten SAG1 im Überstand bestätigen die komplette Trennung der löslichen Fraktion von der unlöslichen Fraktion (Abbildung 17A).



**Abb. 17: GRA9 liegt als freies und aggregiertes Protein in DGs vor, aber nur die lösliche Form wird sekretiert.**

**(A)** Die Ultraschall-Behandlung von extrazellulären Parasiten zeigt, dass sich GRA9 wie das amphiphile GRA2-Protein verhält, wobei circa 50% des Proteins solubilisiert vorliegen (S) und der Rest im Pellet (P) bleibt. Als Kontrollen der Fraktionierung dienten GRA1 als lösliches Protein und SAG1 als membran-assoziiertes Protein. Die Behandlung von extrazellulären Parasiten mit Triton X-114 demonstriert, dass GRA9 hauptsächlich in der wässrigen Phase (A) vorliegt und in geringeren Mengen sowohl in der Detergent-Phase (D) als auch im unlöslichen Pellet (I) zu finden ist. GRA2 und GRA5 werden erwartungsgemäß in der wässrigen (A) und in der Detergent-Phase gefunden. Der Nachweis der verschiedenen Proteine erfolgte, wie beschrieben, mittels Western Blot.

**(B)** Das durch „freeze/thawing“(F/T)-Behandlung gewonnene Pellet wurde mit NP-40 und Harnstoff weiterbearbeitet. GRA9, GRA2 und GRA5 werden nur zum Teil durch Harnstoff gelöst. Mehr als 80% von GRA9 und GRA2 werden durch NP40 gelöst, während GRA5 völlig in gelöster Form vorliegt. Der Nachweis der verschiedenen Proteine erfolgte, wie beschrieben, mittels Western Blot.

Mit Hilfe von Triton X-114 werden Proteine durch ihre Affinität für hydrophile oder hydrophobe Umgebung getrennt. Nach der Behandlung von extrazellulärem Tachyzoiten-Lysat mit Triton X-114, wird GRA9 eher in der wässrigen Phase (A) detektiert.

Ein kleiner Anteil verteilt sich auf die Detergent-Phase (D) und auf die unlösliche Phase (I). Im Gegensatz dazu, kommen GRA2 und GRA5 hauptsächlich in der wässrigen Phase vor,

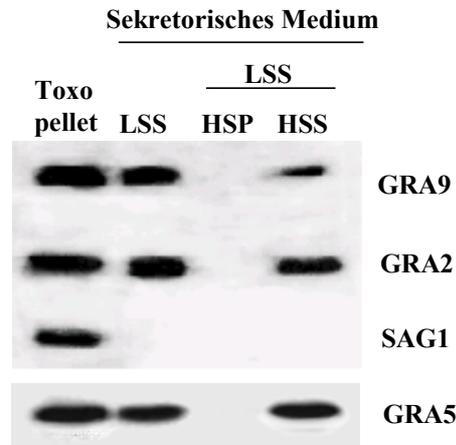
und nur als Spuren in der Detergent-Phase. Wie erwartet wird GRA1 nur in der wässrigen Phase gefunden, während das Membran-assoziierte SAG1 in der Detergent-Phase zurückbleibt (Abbildung 17A).

Um die Anwesenheit von GRA9 in der Detergent-Phase und in der unlöslichen Phase nach der Behandlung mit Triton X-114 genauer zu untersuchen, wurden extrazelluläre Tachyzoiten mit drei Zyklen Einfrieren /Auftauen (freeze-thawing F/T) aufgeschlossen und das dadurch gewonnene Lysat mit Hilfe differentieller Zentrifugation und Western-Blot näher analysiert. Die Abbildung 12B zeigt die Bestätigung des amphiphilen Charakters von GRA9, welches sich wie GRA2 verhält. Der in den DGs gebundene GRA9-Anteil lässt sich nur teilweise durch chaotropische Agenzien (Harnstoff, Urea) oder nicht-ionische Agenzien (NP-40) solubilisieren. Wie bereits publiziert, wird das als Kontrolle gleichzeitig analysierte GRA5 durch NP-40 völlig solubilisiert.

Diese Resultate zusammengenommen zeigen, dass GRA9 wie die meisten bisher beschriebenen GRA-Proteine, sowohl in freier als auch in aggregierter Form in den DGs existiert.

Die Sekretion von GRA-Proteinen bei *Toxoplasma* erfolgt konstitutiv (Chaturvedi *et al.*, 1999). Unmittelbar nach der Invasion wird ein Anteil der GRA-Proteine in die PV freigesetzt (Carruthers & Sibley, 1997). Der natürliche Induktor dieser Sekretion ist noch unklar, aber die Sekretion von GRA-Proteinen lässt sich experimentell durch eine drei-stündige Inkubation von extrazellulären Tachyzoiten in einem FCS supplementierten DMEM-Medium bei 37°C induzieren (Zenner *et al.*, 1998; Coppens *et al.*, 1999). Durch die Benutzung dieser klassischen Methode wurde bereits gezeigt, dass GRA9 zu den „excretory-secretory antigen“ ESA gehört (Nockemann *et al.*, 1998; Abbildung 18).

Die Abwesenheit von SAG1 in der ESA-Fraktion bestätigt, dass die GRA-Proteine, die in der ESA-Fraktion detektiert wurden, durch eine aktive Sekretion und nicht durch Lyse der Parasiten freigesetzt worden waren. Die weitere Analyse der sekretierten Fraktion (LSS) durch differentielle Zentrifugation zeigt, dass GRA9 sowie GRA1, GRA2 und GRA5 im „high speed supernatant“ (HSS) vorliegen (Abbildung 18). Dieses Experiment zeigt ferner, dass GRA9, GRA2, GRA5 sowie alle anderen GRA-Proteine nur in löslicher Form von den DGs sekretiert werden.



**Abb. 18: In der ESA-Präparation liegt GRA9 nur als freies, nicht aggregiertes Protein vor.**

Die Inkubation von extrazellulären Tachyzoiten in 10% „fetal calf serum“ für drei Stunden induziert die Sekretion von GRA-Proteinen (LSS). Die Zentrifugation des Sekretionsmediums bei 100 000 x g zeigt, dass die sekretierten GRA-Proteine völlig löslich sind (HSS). SAG1, das Hauptoberflächen-Toxoplasmen-Protein wird ins Sekretionsmedium nicht freigesetzt. Der Nachweis der verschiedenen Proteine erfolgte, wie beschrieben, mittels Western Blot.

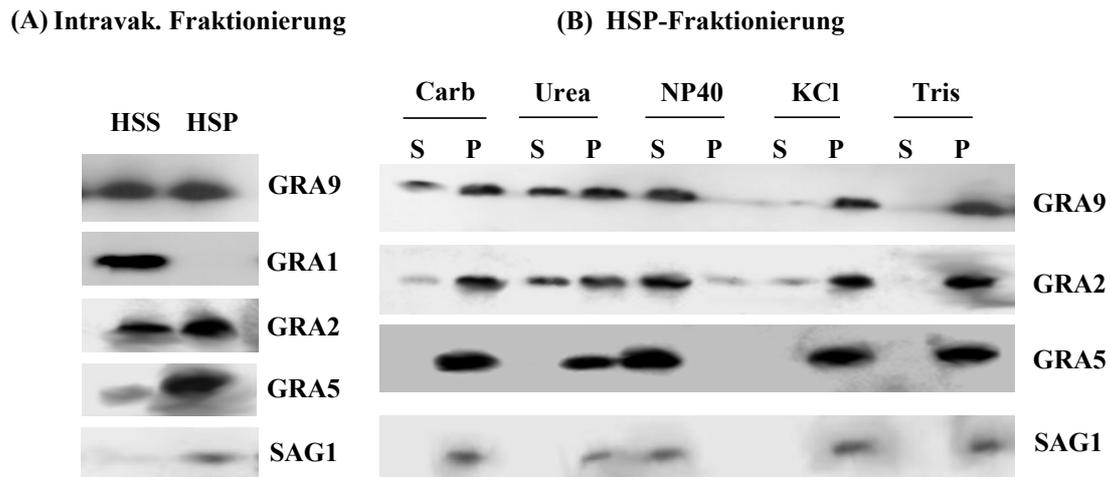
LSS: Low-speed-supernatant, HSS: High-speed-supernatant; HSP: High-speed-pellet

### III.3.4 Bindung von GRA9 an das Netzwerk in der parasitophoren Vakuole

Die Detektion von GRA9 mittels EM (Abbildung 12) bestätigt nicht nur die Freisetzung von GRA9 in das Lumen der PV, sondern auch seine enge Assoziation mit dem membranösen Netzwerk.

Um die Natur der Assoziation von GRA9 mit dem Netzwerk näher zu untersuchen, wurden mit Tachyzoiten infizierte HFF-Zellen mechanisch aufgeschlossen, die Membranen des intravakuolären Netzwerks wurden danach mittels differentieller Zentrifugation präpariert (Sibley *et al.*, 1995; Mercier *et al.*, 1998).

Die Abbildung 19A zeigt, dass GRA9 sowie GRA2 in vergleichbaren Mengen in der löslichen „high-speed-supernatant“ Phase und in der membranösen Fraktion der Vakuole, dem „high-speed-pellet“, zu finden sind. GRA5 und SAG1 wurden eher als Membran-assoziierte Proteine detektiert, während GRA1 hauptsächlich in löslicher Form vorliegt.



**Abb. 19: Nach seiner Sekretion in die PV, ist GRA9 sehr stabil mit dem Netzwerk assoziiert.**

(A) Übernachtskultur von Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen wurde in Kalzium-freien PBS mechanisch in einer 25G-Kanüle aufgeschlossen und die parasitenfreien Komponenten durch Zentrifugation (100 000 x g) in „high speed supernatant“ (HSS)- und „high speed pellet“ (HSP)-Fraktionen getrennt. GRA9 und GRA2 wurden als lösliche und membran-assoziierte Proteine detektiert. Im Gegensatz dazu, wurde GRA5 als integrales Membranprotein im Pellet gefunden, während GRA1 als lösliches Protein im Überstand detektiert wurde.

(B) Die HSP-Fraktion wurde mit verschiedenen membranstrukturedestabilisierenden Chemikalien behandelt. GRA9 wird mit NP-40 von der Membran entfernt, während ein Teil noch gegen die Auflösung durch Natriumkarbonat (Carb) und Harnstoff (Urea) widersteht. Der Nachweis der verschiedenen Proteine erfolgte, wie beschrieben, mittels Western Blot.

Die HSP-Fraktion wurde mit verschiedenen destabilisierenden Agenzien weiter verarbeitet, um die Interaktion von GRA9 mit dem Netzwerk zu identifizieren. Genauso wie in bereits publizierten Arbeiten, zeigt die Western-Blot-Analyse der verschiedenen Fraktionen, dass sich die membranösen Formen von GRA2 und GRA5 als integrale Membranproteine verhalten und nur durch nicht-ionische Detergenzien (NP-40) von der Membran gelöst werden (Abbildung 19B). Das Löslichkeitsmuster von GRA9 ist sehr ähnlich zu dem von GRA2. GRA9 wird nur noch komplett durch NP-40 von dem Pellet gelöst. Damit ist anzunehmen, dass GRA9 sehr fest an die Membranen des intravakuolären Netzwerks gebunden ist.

Insgesamt kommt GRA9, wie die bislang beschriebenen GRA-Proteine, in zwei Formen in der parasitophoren Vakuole vor. Das membranassoziierte GRA9 ist, wie die Analyse der Aminosäuresequenz ergab, kein integrales Membranprotein, sondern wahrscheinlich direkt oder über eine Protein-Protein-Interaktion mit dem vakuolären Netzwerk assoziiert.

### III.3.5 Protein-Protein-Interaktionen

Protein-Protein-Interaktionen sind keine Seltenheiten in *T. gondii*. Solche Reaktionen wurden für die Mikronemenproteine MIC1, MIC4 und MIC6 beschrieben, wobei MIC6 als ein „escorter“ für eine richtige Sortierung von MIC1 und MIC4 fungiert (Reiss *et al.*, 2001). Ähnliche Befunde gibt es auch bei GRA-Proteinen, so bilden GRA2, GRA4 und GRA6 durch hydrophobe Stabilisierung und durch Protein-Protein-Interaktion einen trimeren Komplex in der Membran des Netzwerks (Labruyere *et al.*, 1999).

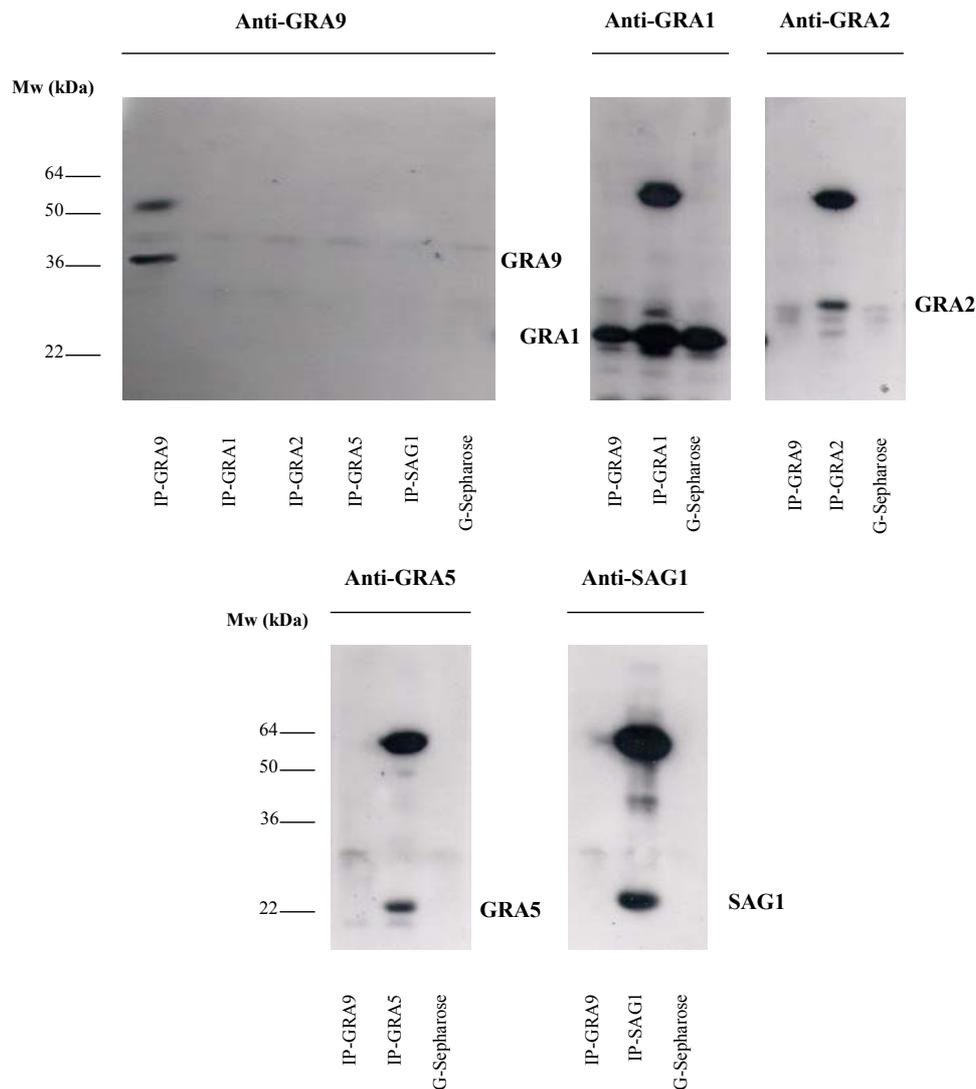
Die vorherigen Abschnitte dieser Arbeit zeigten, dass GRA9 als lösliches Protein in die PV sekretiert wird, mit dem intravakuolären Netzwerk assoziiert und die innere Seite der PVM dekoriert. Um die Frage aufzuklären, ob GRA9 mit anderen Toxoplasmenproteinen Interaktionen eingeht, wurden Co-Immunpräzipitationsversuche durchgeführt. Hierfür wurde eine Übernachtskultur Tachyzoiten-infizierter HFF-Zellen geerntet und anschließend mechanisch mit einer 25G-Kanüle aufgeschlossen. Dabei werden die Tachyzoiten aus den infizierten HFF-Zellen freigesetzt und können mit verbleibenden Zellresten (Debris) durch Zentrifugation sedimentiert werden. Das in Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer) aufgenommene Pellet wurde dann mit spezifischen anti-GRA9, -GRA1, -GRA2, -GRA5 und -SAG1 Antikörpern inkubiert.

Die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend auf einer Protein G-Sepharose-Matrize isoliert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden dann mittels SDS-PAGE separiert und durch Western-Blot analysiert.

Das Protein SAG1 diente in diesem Experiment als eine Negativekontrolle. Bei SAG1 handelt es sich um ein GPI-verankertes Oberflächenprotein, daher ist eine Interaktion mit dem exkretorischen Protein GRA9 ausgeschlossen.

Die Abbildung 20 zeigt, dass GRA9 weder mit GRA1, GRA2, GRA5 noch mit SAG1 copräzipitiert, denn in keinem der erhaltenen Immunpräzipitate war GRA9 im Western-Blot nachweisbar.

Die gleichen Resultate wurden erhalten, indem die GRA9 Immunpräzipitate mit den anti-GRA2, anti-GRA5 und anti-SAG1 Antikörpern analysiert wurden. Die Detektion von GRA1 im IP-GRA9 mit dem GRA1 Ak ist nicht auf ein Copräzipitat mit GRA9 zurückzuführen, denn GRA1 interagiert direkt mit der Protein G-Sepharose.



**Abb. 20: GRA9 interagiert weder mit GRA1, GRA2 noch mit GRA5.**

Tachyzoiten-infizierte HFF-Zellen (20:1) wurden abgeschabt und in einem Immunpräzipitationspuffer aufgenommen. Es erfolgte ein mechanischer Aufschluss mit einer 25G-Kanüle und anschließend eine Zentrifugation bei 2000 x g. Der Überstand wurde mit den GRA9-, GRA1-, GRA2- und SAG1-Antikörpern über Nacht inkubiert. Die Immunpräzipitate (IP-GRA9, IP-GRA1, IP-GRA2, IP-GRA5 und IP-SAG1) wurden auf die Protein G-Sepharose geladen und anschließend in einer SDS-PAGE getrennt. Die unterschiedlichen Protein-Banden wurden durch Western-Blot analysiert. Die in allen Abbildungen dargestellte Bande bei ca. 57kDa entspricht der mitgeschleppten schweren Kette des Maus bzw. Kaninchen Immunglobulins.

Dies zeigt sich in dem Kontrollenansatz, in welchem die Protein G-Sepharose mit Überstand ohne Antikörper inkubiert wurde.

Insgesamt ist zu sagen, dass die hier überprüften *Toxoplasma* Proteine nicht mit GRA9 interagieren. Die Assoziation von GRA9 mit dem Netzwerk ist daher nicht auf eine Interaktion mit GRA-1, GRA2 oder GRA5 zurückzuführen. Daraus kann man schließen, dass GRA9 entweder selbstständig mit dem Netzwerk interagiert oder über andere Proteine DER

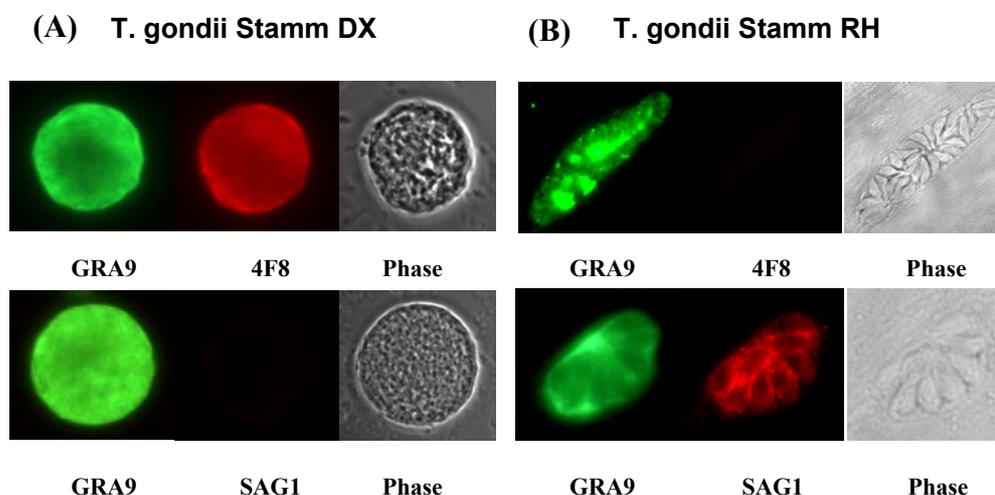
Membranen die nicht in den jetzigen Versuchen überprüft wurden, interagiert. Insbesondere sind die GRA-Proteine GRA4 und GRA6 in der PV oder GRA3, GRA7 und GRA8 in der PVM weitere potentielle Interaktionskandidaten.

Die Interaktion zwischen den GRA Proteinen in der PV ist eine wichtige Eigenschaft, wobei sie zusätzlich mit dem Netzwerk und der PVM eine Austauschplattform für den Parasiten und die Wirtszelle bilden. Diese Austauschplattform ist nicht nur im Tachyzoitenstadium wichtig, sondern auch für das Bradyzoitenstadium, in dem, abgesehen von NTPase, alle bisherig beschriebenen GRA Proteine konstitutiv exprimiert werden.

### III.4 Stadienspezifische Expression von GRA9

*Toxoplasma gondii* kann neben dem bisher untersuchten Tachyzoitenstadium auch im Bradyzoiten- bzw. Sporozoitenstadium vorliegen. Mittels Immunfluoreszenzanalysen wurde die Expression von GRA9 in Bradyzoiten untersucht.

Die Abbildung 21 zeigt, dass nur die intrazellulären Tachyzoiten deutlich das Tachyzoiten-spezifische SAG1 Antigen exprimieren, während der Bradyzoiten-spezifische Marker 4F8 nur die Bradyzoiten in der Hirnzyste anfärbt.



**Abb.21: Expression des GRA9 Proteins in Tachy- und Bradyzoiten.**

Immunfluoreszenzanalyse von Maus-Hirnzysten vom *T. gondii* Stamm DX (A) und von intrazellulären Tachyzoiten des *T. gondii* Stamms RH (B). Paraformaldehyd-Präparate wurden in einer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GRA9 und SAG1 bzw. den Bradyzoitenmarker 4F8 gefärbt. GRA9-spezifische Ak wurden mit Cy<sup>2</sup> markierten, SAG1 bzw. 4F8 Ak mit Cy<sup>3</sup>-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen.

Der Nachweis der stadienspezifischen Proteine in Bradyzoiten und Tachyzoiten bestätigt die im Phasenkontrast rein morphologisch definierte Identifikation von Vakuole und Zyste.

Die Abbildung 21 zeigt eindeutig, dass GRA9 in beiden Stadien exprimiert wird.

### **III.5 Funktionelle Charakterisierung von GRA9 mittels „Knock-out“ Mutante**

GRA9 ist ein sekretorisches Protein und wird in die parasitophore Vakuole abgegeben. Dort liegt GRA9 am Netzwerk assoziiert vor und spielt wie die anderen GRA-Moleküle wahrscheinlich eine Rolle bei der Nährstoffweiterleitung von der Wirtszelle zum Parasiten (Carruthers, 1999). Die funktionelle Charakterisierung des GRA9 Proteins durch Herstellung einer „knock out“ Mutante sollte dessen Rolle für *T. gondii* verdeutlichen. Die Herstellung von „knock out“ Mutanten bei *T. gondii* erfolgt durch homologe Rekombination, wobei große flankierenden Sequenzen (größer als 1000 Basenpaare) des auszuschaltenden Gens bekannt sein müssen.

#### **III.5.1 Isolierung der flankierenden DNA-Sequenzen des GRA9-Lokus durch „Genome Walking“**

Die Häufigkeit von homologen Rekombinationsereignissen nimmt mit der Länge der homologen Gensequenzen zu (Roos *et al.*, 1994). Zu Beginn dieser Arbeit waren die flankierenden Sequenz von GRA9 unbekannt, deshalb mussten diese erst durch sog. „Genome Walking“ isoliert werden (Siehe Material und Methoden).

Die Anwendung der Methode des „Genome Walking“ der Firma Clontech war erfolgreich: die kleinen, bekannten, flankierenden Regionen des GRA9-Genlokus konnten auf je >2000 Basenpaare (bp) (von 358 bp auf 2089 bp für 5'flankierende Region und von 449 bp auf 2700 bp für 3'flankierende Region) verlängert werden. Die isolierten Fragmente wurden in pGEMTeasy-Vektoren subkloniert. Die Sequenzierungsdaten der flankierenden Regionen und des GRA9-Lokus sind in der EMBL Datenbank unter Acc.No. AY371455 von uns in Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht.

Nach der Analyse der Sequenz der flankierenden Regionen des GRA9 Lokus konnte nun die Ziel-Vektor-Konstruktion beginnen.

Zu Beginn der Ziel-Vektor-Konstruktion blieb die Frage zu klären, ob der GRA9-Promotor beibehalten werden soll oder ob der gewöhnlich eingesetzte *T. gondii*  $\beta$ -Tubulin (TUB1) Promotor (Soldati & Boothroyd, 1993) für die Steuerung des Selektionsmarkergens verwendet werden sollte. Da die GRA Proteine von *T. gondii* der Kontrolle von starken

Promotoren unterliegen (Black & Boothroyd, 2000), war es notwendig die „upstream“ flankierende Region des GRA9-Lokus genauer zu untersuchen.

### III.5.2 Charakterisierung der Promotorenregion des GRA9 Gens

Die DNA-Sequenzen, die die essentiellen Regionen für die Expression der GRA-Proteine umfassen, zeigen keine signifikanten Homologien zu bekannten eukaryotischen Promotoren. Insbesondere werden keine TATA-box- oder SP1-Konsensus-Motive gefunden (Dynam *et al.*, 1985; Mitchell & Tjian, 1989).

Alle GRA Proteine folgen den selben Transportwegen und werden gleichzeitig sekretiert (Cesbron-Delauw & Capron, 1993). Dies deutet daraufhin, dass die GRA-Proteinen alle auf eine ähnliche Art reguliert werden und deren Promotorregionen die gleichen oder verwandte regulatorische „*cis-acting*“ Elemente beinhalten (Mercier *et al.*, 1996).

In der Tat, der Vergleich der „upstream“ DNA-Sequenz von verschiedenen GRA-Genen weist ein Heptanukleotidmotiv (**A/TGAGACG** oder **A/CGAGACG**) auf.

Die „upstream“ DNA-Sequenz-Analyse von GRA9 zeigt das Motiv **CGAGACG** in Position –400 vor dem Translationstartcodon. Zusätzlich werden drei **CAAT**-Motiven in Positionen -1173, -1258 und –1338 upstream des Startcodons gefunden. Die hier angegebenen Positionen beziehen sich auf das Translationstartcodon also nicht auf das Transkriptionsstartcodon, da eine Lokalisierung der Cap-Struktur durch „Primer extension“ in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Die Identifizierung der beiden Arten von Promotor-Motiven in der DNA-Sequenz „upstream“ des GRA9 Lokus führte zu der Entscheidung, diese Promotorregion für die Steuerung der Expression des Selektionsmarkers beizubehalten und nicht durch den TUB1 Promotor zu ersetzen.

Zusätzlich zu den „*cis-actin*“Elementen, zeigen die computergestützten Sequenzanalysen der 5'flankierenden Region des GRA9 die Existenz eines bislang unbekanntes Gens an. Die DNA-Sequenz-Analyse dieser Region durch Sequenzvergleich auf der speziellen *T. gondii*-Homepage „*Toxoplasma* Database (ToxoDB)“ identifizierte fünf überlappenden *T. gondii* spezifische „Expressed sequence tag (TgEST)“: TgESTcqual-14-309, TgESTcqual-14-310, TgESTcqual-14-448, TgESTcqual-14-627 und TgEST-100119542.

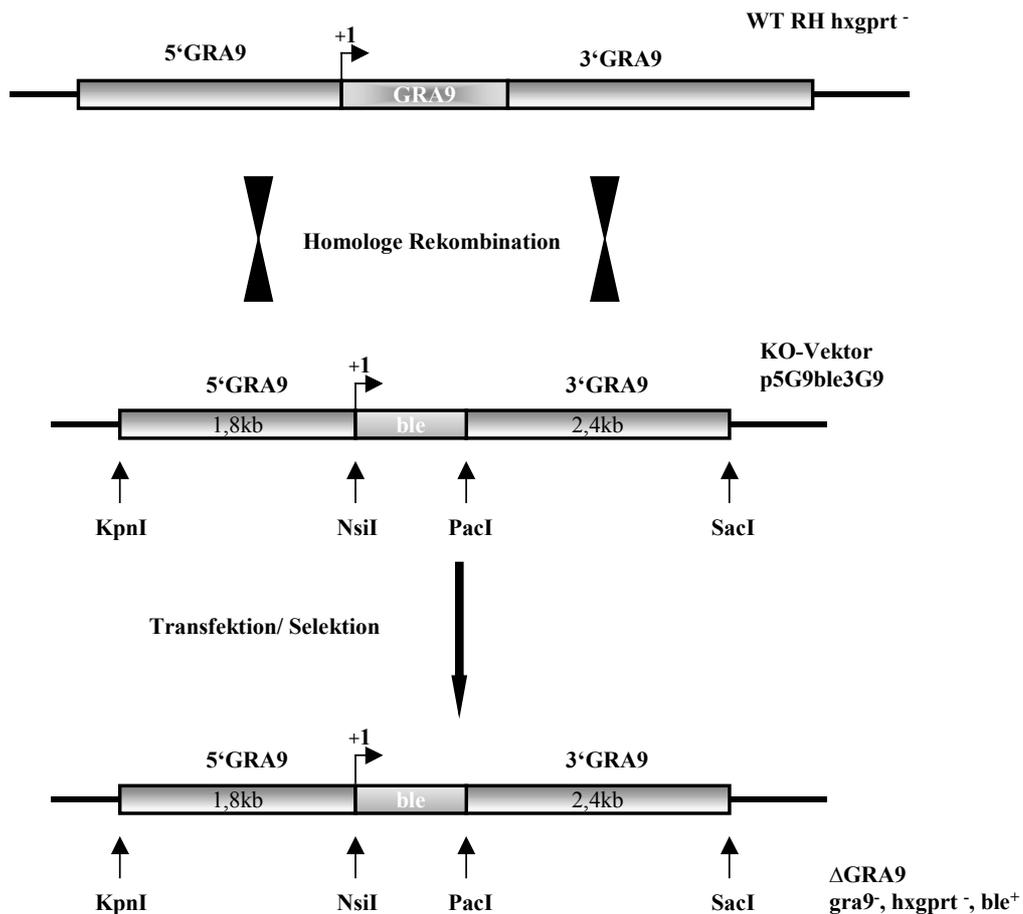
Mit Hilfe von Sequenz-Konsensus-Analysen („Tg consensus“ -gNCAAaATG g- und „Sporozoa-consensus“ -T/ANAAAA ATG A-) zur Ermittlung von Startcodons für die Translation von *T. gondii* Proteinen, wurden zwei mögliche Startcodons für das neue Gen mit dem putativen Namen D1 gefunden.

Unter Verwendung der in dieser Arbeit hergestellten cDNA von *Toxoplasma gondii*, wurde die Expression des D1-Gens mit Hilfe von spezifischen Primer bestätigt. Die Charakterisierung dieses Gens konnte leider nicht in dieser Arbeit weitergeführt werden.

### **III.5.3 Konstruktion des Zielvektors und Herstellung von GRA9-„Knock-out“-Mutanten**

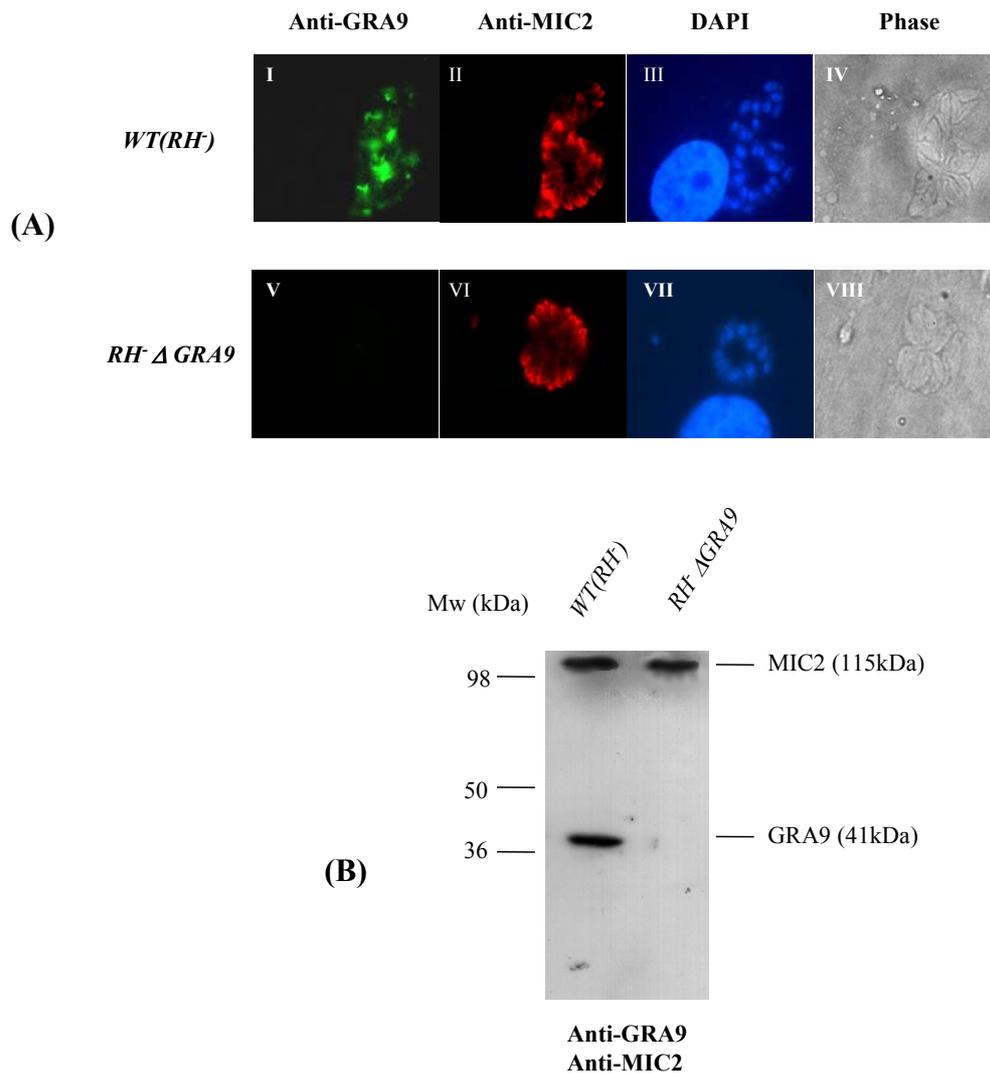
Für die Herstellung der „Knock out“ Mutante wurde eine im *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HXGPRT)*-Gen deletierte Mutante des *T. gondii* Stammes RH verwendet (Roos *et al.*, 1994). Diese Mutante lässt erweiterte Selektionsmöglichkeiten nach Transfektion zu und ist gleichwohl hochvirulent wie der RH Stamm (Mercier *et al.*, 2001). In der folgenden Abbildung 22 ist schematisch der GRA9-Genlocus, das „knock out“-Plasmidkonstrukt und der GRA9-Lokus nach Austausch des GRA9 ORFs dargestellt.

Die isolierten DNA-Fragmente von 1,8 kb 5'-seitig und 2,4 kb 3'-seitig wurden sequenziert und wie beschrieben flankierend zum Selektionsmarker *ble* (kodierendes Gen für Bleomycin/Phleomycin Resistenz) in das Plasmid p5G9ble3G9 kloniert. Nach Transfektion des RH *hxgprt* - *T. gondii*-Stamms mit dem Plasmid p5G9ble3G9 wurden stabil transfizierte Parasiten mit Phleomycin selektioniert und *ble*-exprimierende Tachyzoiten kloniert. Bleomycin-resistente Klone wurden in der Immunfluoreszenzanalyse und Western-Blot-Analyse hinsichtlich der Expression von GRA9 untersucht.



**Abb. 22: Genomische Restriktionskarte und schematische Darstellung des „Knock out“-Vektors für die Herstellung der *GRA9*-defizienten Mutante ( $\Delta$ GRA9).**

Das Plasmid zur Generierung der  $\Delta$ GRA9-Mutante enthält 1,8 kb des 5'UTR und 2,4kb des 3'UTR und ein 370bp lang *ble*-ORF. Der ORF von *GRA9* wird durch homologe Rekombination mit dem *ble*-ORF ersetzt. Die Transfektion erfolgt durch Elektroporation.



**Abb. 23: „Knock out“ Mutanten ( $\Delta$ GRA9) exprimieren kein GRA9 Protein.**

**(A) Immunfluoreszenz-Analyse von GRA9 bei  $\Delta$ GRA9 und Wildtyp (RH):** Tachyzoiten-infizierte HFF-Zellen wurden 36 Stunden kultiviert, mit 4% PFA fixiert und anschließend mit 0,2% Triton-X 100 permeabilisiert. Es folgte eine Inkubation mit Ak gegen GRA9 (I,V) und mit Ak gegen MIC2 (II, VI). Anti-GRA9 Ak wurde mit Cy<sup>2</sup>-markierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht, während anti-MIC2 mit Cy<sup>3</sup>-markierten Sekundärantikörpern detektiert wurde. Zellkern-DNA wurde mit DAPI angefärbt (III, VII).

**(B) Western-Blot- Analyse von intrazellulären WT(RH) - und  $\Delta$ GRA9-Tachyzoiten:**

Intrazelluläre WT(RH) und  $\Delta$ GRA9-Tachyzoiten wurden aus Wirtszellen isoliert und Gesamtprotein wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit Ak gegen MIC2 und GRA9 inkubiert.

Für die phänotypischen Untersuchungen von GRA9-Ko-Mutanten mittels Immunfluoreszenzanalysen wurden HFF-Zellen, die zuvor mit GRA9-defizienten Toxoplasmen infiziert worden waren, mit GRA9- und MIC2-spezifischen Antikörpern inkubiert.

Die Abbildung 23A zeigt Immunfluoreszenzanalysen von Wildtyp- und *RH ΔGRA9*-Tachyzoiten, wobei die Zellkerne (der Toxoplasmen und der HFF-Zelle) mit DAPI blau anfärbbar sind. Die Färbung mit anti-GRA9 Ak blieb bei der *RH ΔGRA9*-Mutante negativ (Abbildung 23A V) im Gegensatz zu dem Wildtyp (*RH*) (Abbildung 23A I). In einer parallel durchgeführten Immunfärbung markierten die MIC2-spezifischen Ak den apikalen Pol des Parasiten sowohl bei *RH ΔGRA9*-Mutanten als auch bei Wildtyp.

In Immunoblot-Analysen (Abbildung 23B) von  $1 \times 10^8$  aus ihren Wirtszellen isolierten *RH ΔGRA9*-Mutanten - und Wildtyp-Tachyzoiten wurde mit MIC2-spezifischen Antikörpern eine Bande bei ca. 115 kDa markiert. Die Expression von MIC2 war in beiden *Toxoplasma*-Präparationen vergleichbar. Anti-GRA9 Ak markierte nur noch bei dem Wildtyp die erwartete GRA9 Bande von ca. 41kDa. Damit ist gezeigt, dass die *RH ΔGRA9*-Mutanten kein GRA9 Protein mehr exprimieren.

#### **III.5.4 Phänotypische Charakterisierung der GRA9-defizienten Toxoplasmen**

Eine detaillierte Charakterisierung der GRA9 defizienten Toxoplasmen konnte in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Eine besonders auffallende Eigenschaft der GRA9-defizienten Toxoplasmen ist deren Letalität nach einigen Passagen (4-8 Passagen). Dazu ist eine stark ausgeprägt morphologische Veränderung zu erwähnen, wobei die immer kleiner werdenden Mutanten kurz vor dem Absterben eher eine globuläre (kugelförmig) Form annehmen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass GRA9 zu den essentiellen Genen von *Toxoplasma gondii* gehört.

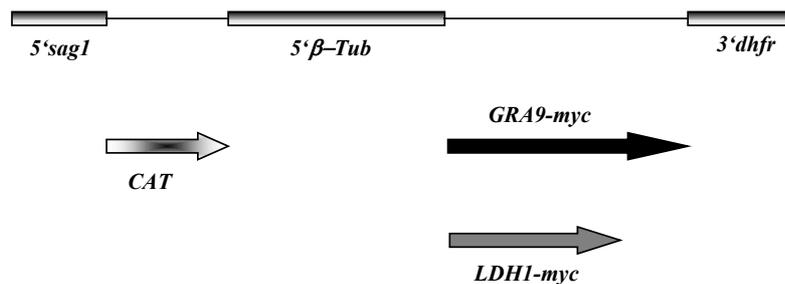
Das gezielte Ausschalten eines Gens durch Gen-Austausch ist an sich eine radikale Methode, wobei die erhaltenen Informationen eher vom „Nicht Dasein“ des ausgeschalteten Gens berichten.

Eine andere Methode der funktionellen Charakterisierung eines Gens ist die erhöhte Präsenz dieses Gens durch die Multiplizierung der Kopiezahl, die seine Überexpression als Folge hat.

### III.6 Überexpression von GRA9 in Toxoplasmen

#### III.6.1 Konstruktion des Expressionsvektors pGRA9-myc

Die Überexpression von GRA9 in RH-Toxoplasmen wurde durch Transfektion mit einem Expressionsplasmid erreicht. Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pTub-myc für die GRA9-Expression mit der cDNA GRA9 versehen.



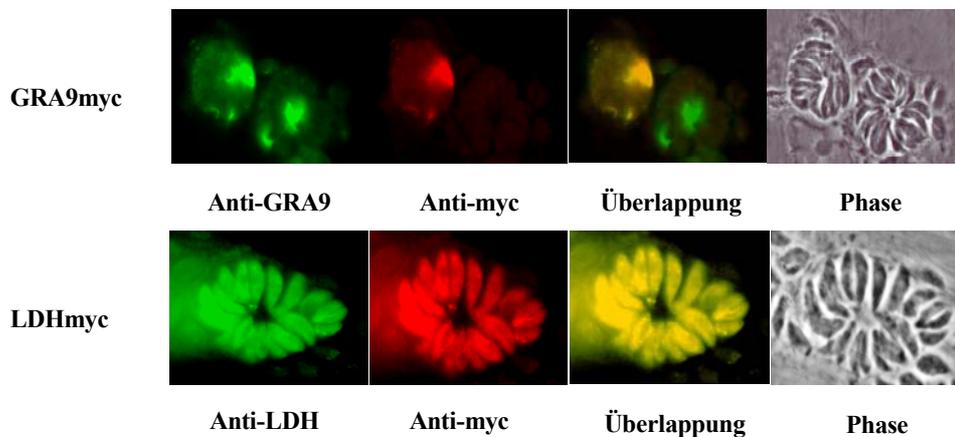
**Abb. 24: Schematische Darstellung der Überexpressionsvektoren.**

Die cDNA Sequenzen für GRA9 im pGRA9-myc Plasmid bzw. für LDH1 im pLDH1myc Plasmid sind mit einem schwarzen bzw. grauen Pfeil dargestellt. Die Promotoren von  $\beta$ -tubulin bzw. *sag1* für die Transkription von *gra9*, *ldh1* bzw. *cat* sind als graue/ weiße Balken abgebildet. Die *cat*-cDNA ist als grauer/weißer Pfeil skizziert.

Zur Kontrolle wurde die cDNA des LDH1-Proteins, das eher zytoplasmatisch lokalisiert ist, in pTub-myc kloniert. Von den Expressionsplasmiden pGRA9-myc bzw. pLDH1-myc wurden die cDNAs von GRA9 bzw. LDH1 transkribiert. Die Transkription wurde dabei vom *T. gondii*  $\beta$ -Tubulin-Promotor ( $\beta$ -Tub) kontrolliert. Beide Proteine wurden C-terminal mit einem ‚myc-tag‘ versehen (GRA9-myc; LDH1-myc). Als Selektionsmarker zur Generierung stabiler *T. gondii* Linien wurde Chloramphenicol, das bei den Transfektanten von plasmidkodierter Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) inaktiviert werden kann, verwendet.

#### III.6.1 Transiente Expression von GRA9-myc und LDH1-myc in Toxoplasmen

Die Plasmide pGRA9-myc bzw. pLDH1-myc wurden durch Elektroporation in *T. gondii* RH transfiziert und die Expression der Transgene nach 24 h durch Immunfluoreszenzanalyse verifiziert. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten nahezu alle transgenen Toxoplasmen die modifizierten Proteine. Die Abbildung 25 verdeutlicht den Unterschied zwischen den Zellkolonien bezüglich der Expression von GRA9 durch das Plasmid pGRA9-myc.



**Abb. 25: Transiente Expression von GRA9-myc und LDH1-myc in Toxoplasmen (RH).**

Doppelte Immunfluoreszenzanalyse intrazellulärer Tachyzoiten in HFF 24 h nach der Transfektion mit pGRA9myc bzw. pLDH1myc. Paraformaldehyd-fixierte Präparate wurden mit anti-Myc, anti-LDH1 und anti-GRA9 Ak inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit Cy<sup>2</sup>- bzw. Cy<sup>3</sup>-markiertem Sekundärantikörper.

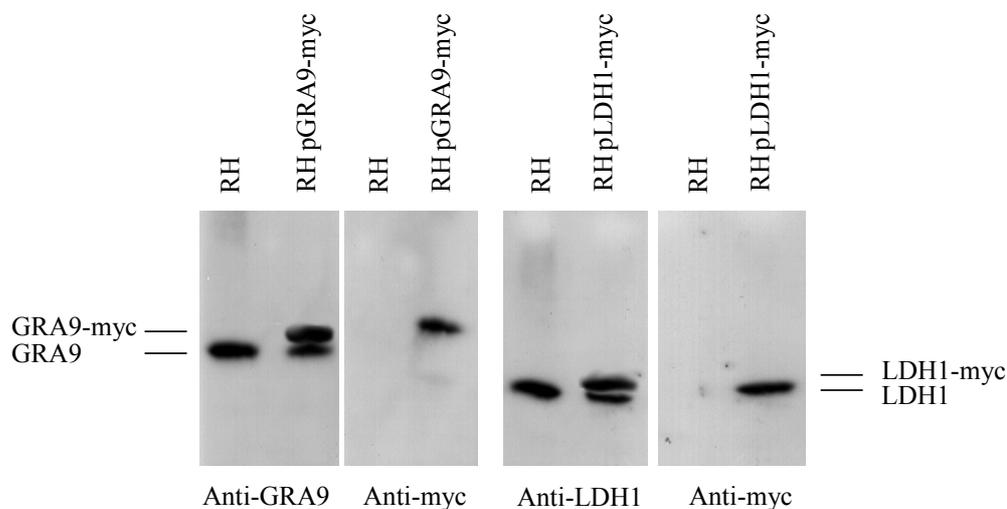
Die Toxoplasmen welche GRA9 myc exprimieren, lassen sich in der Immunfluoreszenzanalyse mit GRA9-spezifischen Antikörpern und mit anti-Myc Antikörpern anfärben. Einige der Vakuolen enthalten jedoch Toxoplasmen, die kein modifiziertes GRA9 exprimieren, was an der fehlenden Darstellung dieser Vakuolen mit dem anti-Myc Ak erkennbar ist.

Bei der Transfektion von Toxoplasmen (RH) mit pLDH1-myc waren ebenfalls sowohl Vakuolen mit starker LDH1-myc-Expression detektierbar als auch Vakuolen mit Parasiten, die keine Expression des myc-Epitops zeigten.

Die Färbung der gezeigten Vakuolen mit dem anti-Myc Antikörper beweist prinzipiell nur die Expression des auf dem Expressionsvektor liegenden Gens. Interessant ist aber auch die subzelluläre Verteilung der gefärbten Strukturen, diese ist zytoplasmatisch für LDH1 und vakuolär für GRA9. Diese Resultate wurden durch die doppelte Markierung der selben Vakuolen mit GRA9 bzw. Anti-myc spezifischen Ak bestätigt (Abbildung 25). Somit lässt sich sagen, dass die Fusionsproteine in Tachyzoiten (RH) exprimiert wurden, und dass die Verteilung der normalen (Wildtyp) und der „myc“- GRA9- bzw -LDH1-Proteine in den Mutanten identisch ist.

Western-Blot Analysen mit GRA9-spezifischen Antikörpern ergaben einen GRA9 Nachweis sowohl in Wildtyp RH Toxoplasmen, als auch in den GRA9-überexprimierenden Toxoplasmen.

Die reduzierte Mobilität des GRA9-myc Fusionsprotein im SDS-Gel um ca. 5 kDa lässt sich nicht allein durch die Molekulargewichtsdifferenz zwischen modifiziertem und nativen GRA9 erklären. Das angefügte Myc-Epitop besteht nur aus zwölf Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von ~1300 Da entspricht. Folglich müssen hier sterische Effekte eine Rolle spielen.



**Abb. 26: GRA9 und LDH1 Expression der Klone RHpGRA9-myc und RHpLDH1-myc.**

Es wurde Gesamtprotein aus  $2 \times 10^6$  Toxoplasmen je Spur von RH-, RHpGRA9-myc und RHpLDH1-myc-Toxoplasmen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und zuerst mit GRA9- bzw. LDH1-spezifischen Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit Peroxidase-markierten anti-Kaninchen Antikörpern. Nach erneutem Blocken erfolgte die Inkubation der Blots mit dem mAk gegen das Myc-Epitop und der Nachweis mit Peroxidase markierten anti-Maus Antikörpern.

Genauso wie bei GRA9 lassen sich zwei Proteine mit unterschiedlicher Mobilität im RHpLDH1-myc- Klon mit den LDH1-spezifischen Ak nachweisen, wobei das Protein mit reduzierter Mobilität zusätzlich durch den myc spezifischen Ak detektiert wurde.

Insgesamt erweist sich, dass die Überexpression von GRA9 in *T. gondii* durch den Vektor pGRA9-myc nichts an der Lokalisierung des Proteins ändert. Somit ist es möglich, dass das GRA9-myc sich funktionell wie das natürliche GRA9 verhält. Damit können diese Transfektanten (RHpGRA9-myc) für weitere biochemische und funktionelle Untersuchungen eingesetzt werden. Besonders interessant wäre die Verwendung des GRA-9

Expressionsvektors in den GRA-9 defizienten Mutanten im Hinblick auf die Frage, ob sich das Absterben der GRA9 defizienten Mutanten durch Einfügen des GRA9 Expressionsplasmids wieder aufheben lässt.

## IV. Diskussion

### IV.1 Das *T. gondii* B10 Protein gehört zu den „dense granules“ Proteinen und erhält die systematische Bezeichnung GRA9

*T. gondii* ist ein obligat intrazelluläres humanpathogenes Protozoon, das zum Phylum Apicomplexa angehört. Dieses Phylum umfasst intrazelluläre Parasiten, die durch eine polarisierte Zellstruktur, d.h. einen zytoskeletalen Komplex und Anordnung typischer Organellen am apikalen Ende des Parasiten charakterisiert sind (Dubey *et al.*, 1998). Während und nach der Invasion der Wirtszelle, setzen die drei typischen sekretorischen Organellen (Mikronemen, Rhoptrien und Dichte Granula) ihren Inhalt sequenziell frei. Diese zeitlich gestaffelte Freisetzung ist wichtig für die intrazelluläre Etablierung und das Überleben der schnell replizierenden Form von *T. gondii* (den Tachyzoiten) (Carruthers & Sibley, 1997). Die in diesen Organellen lokalisierten Proteine werden durch ihre Namen in Kategorien unterteilt:

-MIC für Micronemenproteine (MIC1-10)

-ROP für Rhoptrienproteine (ROP1-8)

-GRA für Dichte Granula oder „dense granules“ Proteine (GRA1-8).

*In vitro* kann die Sekretion der MIC- und GRA-Proteine in extrazellulären Tachyzoiten induziert werden: Die Sekretion von Mikronemenproteinen wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  oder Ethanol induziert (Carruthers *et al.*, 1999), während GRA-Proteine *in vitro* in FCS-haltigem Medium sezerniert werden (Darcy *et al.*, 1988). Die unter FCS-Bedingungen induzierten Proteine bilden die sogenannten „excreted-secreted-antigens“ (ESAs).

Im Vorfeld dieser Arbeit, wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits erkannt, dass das B10 Protein zu den ESAs gehört. Die meisten bisher in den ESA beschriebenen Proteine gehören zu den GRA-Proteinen (Lecordier *et al.*, 1999). Ein weiterer Hinweis, dass B10 zu den GRA-Proteinen gehört, ergibt sich aus seinen immunologischen Eigenschaften. Viele ESAs tragen immunologisch wichtige Determinanten und werden von Antikörpern im Serum von Toxoplasmosepatienten erkannt. Dies ist auch bei dem B10 Protein der Fall, denn Seren von Patienten mit einer chronischen bzw. akuten Toxoplasmose enthalten Antikörper die mit dem B10 Protein (318 AS, 41 kDa) reagieren (Nockemann *et al.*, 1998).

Die Zugehörigkeit vieler Proteine zu Proteinklassen lässt sich häufig durch Sequenzvergleiche erkennen. Abgesehen von einer beachtlichen Homologie (stellenweise bis zu 46%) zur Farnesyltransferase der Maus, zeigt die Sequenz von B10 keine signifikante Homologie zu

bereits bekannten *T. gondii* Proteinen bzw. zu bekannten Proteinen anderer Parasiten aus dem Stamm der Apicomplexa.

Ein gemeinsame Eigenschaft der GRA-Proteine ist die Abspaltung eines N-terminal gelegenen, hydrophoben Signalpeptides (20-24 AS). Eine solche Struktur lässt sich auch in der B10 Sequenz finden. Die Aminosäuresequenzanalyse des B10 Proteins und der bereits charakterisierten GRA-Proteine zeigt die Anwesenheit von Ala, Gly, Ser, Cys in der Position -1 der putativen Abspaltungsstelle und Ala, Gly, Ser, Cys, Thr, Val, Ileu, Leu or Pro in der Position -3, was dafür spricht, dass die Signalpeptide der GRA-Proteine durch die Signalpeptidase vom Typ I entfernt werden.

Um die potenzielle Zugehörigkeit von B10 zu den GRA Proteinen zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Kollokalisierungsexperimente mittels Immunfluoreszenz durchgeführt.

Die Lokalisierung des B10 Proteins in extrazellulären *T. gondii* mit einem selbst hergestellten anti-B10 Serum zeigte die Anwesenheit des Proteins in den extrazellulären Parasiten in Form eines punktförmigen Musters, das in seiner Verteilung an die Struktur der „dense granules“ erinnert. Ferner ist die Verteilung des B10 Proteins in dem Parasiten ähnlich zu der Verteilung von GRA1, einem bekannten, in den Dichten Granula lokalisierten Protein. Aufgrund der niedrigen Auflösung in der IFA, wurde eine genauere Lokalisierung des B10 Proteins mittels Immun-Elektronenmikroskopie (IEM) durchgeführt. Die eindeutige Lokalisierung des B10 Proteins durch EM in den „dense granules“ bestätigt die Beobachtungen in der IFA, und erlaubt uns nun B10 endgültig als GRA-Protein zu definieren. *In vivo* findet man GRA-Proteine innerhalb der parasitophoren Vakuole. Daher wurden Doppel-Immunfluoreszenzanalysen an Tachyzoiten-infizierten HFF-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurden Antikörper gegen jeweils ein typisches Protein aus jeder der sekretorischen Organellen verwendet (anti-GRA1, -ROP1 und -MIC2). Die Ergebnisse in Abbildung 9 zeigen eindeutig, dass das B10 Protein mit dem GRA1 Protein im Lumen der PV kollokalisiert. Die Verteilung des B10 Proteins unterscheidet sich deutlich von der Verteilung der ROP- und MIC-Proteine. Dabei sind ROP1 und MIC2, wie erwartet, im Zytoplasma des Parasiten nachweisbar, während das GRA1 und das B10 Protein in der IF sowohl als punktförmige Strukturen im Zytoplasma des Parasiten als auch als eine amorphe Masse im Lumen der PV angefärbt werden. Die Detektion des B10 Proteins in der PV passt gut zu den bekannten Befunden mit anderen GRA-Proteinen, da diese Proteine die Hauptkomponenten im Lumen der PV darstellen (Achbarou *et al.*, 1991).

Aus der Zusammenfassung der bisher genannten Daten ergibt sich eindeutig, das B10 ein GRA-Protein ist. Die Sequenz dieses Proteins unterscheidet sich deutlich von allen bisher

bekannten GRA-Proteinen (GRA1-8) und B10 wird daher als „neues GRA-Protein“ definiert und erhält nach der von Sibley vorgeschlagenen Nomenklatur die systematische Bezeichnung GRA9.

#### **IV.2 GRA9 kommt in DGs in zwei Formen vor: Eine freie und eine membrangebundene Form**

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, ist B10 ein neues GRA Protein. *In vivo* befinden sich die GRA Proteine innerhalb des Parasiten in den sogenannten „Dense Granules“.

„Dense granules“ werden nicht nur bei Apicomplexa gefunden, sondern auch bei sekretorischen Zellen von Säugetieren wie z.B. in neuroendokrinen und exokrinen Drüsenzellen. Diese Zellen sind in der Lage sekretorische Proteine in konzentrierter Form für längere Zeit zu lagern und sie erst dann freizusetzen, wenn der Bedarf größer ist. Diese Proteine werden in den „dense granules“ gespeichert, die wiederum aus großen unlöslichen Protein-Aggregaten bestehen. Die Aggregate entstehen durch „Selbst-Assoziation“ aus den sekretorischen Proteinen, und werden in dem Trans-Golgi-Komplex gebildet. Das mildere saure Milieu im Lumen des Golgi-Komplexes und dessen hohe Kalzium-Konzentration sind wichtig für die Bildung der Aggregate. Die Aggregate werden dort von kleinen Vesikeln umgeben, die später die sogenannte „dense granules“-Membran bilden, in der Membranproteine verankert sind. Diese Membranproteine sind nicht nur wichtig für den Transport der „dense granules“ zur Plasmamembran, sondern auch für ihr „Andocken“ an der Plasmamembran und für ihre regulierte Freisetzung (Exozytose) (Dannies, 2003).

Die meisten GRA-Proteine kommen innerhalb der DG sowohl in einer „aggregierten“ Form als auch in einer freien Form vor. Allgemein gilt ein Protein, das nach einer einstündigen Zentrifugation bei 100000 x g noch im Überstand verbleibt als solubilisiertes, d.h. freies Protein. Dieses Kriterium gilt nur, wenn der Solubilisierungspuffer kein Glycerin oder andere Bestandteile enthält, welche die Dichte der Lösung erhöhen und die Sedimentationsgeschwindigkeit damit erniedrigen (Tanford *et al.*, 1974)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob GRA9 in den DG in einer aggregierten oder freien Form vorkommt. Nach einstündiger Ultrazentrifugation eines Aufschlusses von in Wasser aufgenommenen extrazellulären Tachyzoiten wird GRA9 immer noch größtenteils im Überstand detektiert. Ein kleiner Teil des GRA9 Proteins kann jedoch auch im Sediment nachgewiesen werden. Damit ergibt sich die Vermutung, dass GRA9 in den DG sowohl in einer freien als auch in einer aggregierten Form vorkommt. Als Kontrolle wurde hier die

Verteilung des GRA1 Proteins analysiert, welches, wie beschrieben, unter gleichen Bedingungen ausschließlich im Überstand nachweisbar ist.

Einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von „aggregiertem“ und „freiem“ GRA9 in den DG ergibt sich aus einer Behandlung der Toxoplasmen mit Triton-X-114. Triton-X-114 ist eine Seife aus p-t-Octyphenyl-polyoxyethylenen und bildet Mizellen (Aggregate von Seifenmolekülen). Die hydrophoben Teile der Seifenmoleküle liegen im Inneren der Mizellen, während die hydrophilen Reste mit dem wässrigen Medium interagieren. Die Mizellengröße von Triton nimmt exponentiell mit der Temperatur zu, bis (am Wolkenpunkt) das Triton ausfällt. Diesen Effekt nutzt die Phasentrennung nach Bordier (Bordier, 1981): Toxoplasmen wurden bei 4°C in Triton-X-114 aufgelöst und die Lösung danach auf 30°C erwärmt. Dabei fällt das Triton-X-114 aus und nach anschließender Zentrifugation liegt eine Triton-X-114-reiche Phase und eine Triton-X-114-arme Phase vor. Nach Bordier enthält die Triton-X-114-reiche Phase die membranassoziierten Proteine, während die löslichen Proteine in der seifenarmen Phase verbleiben.

Nach Aufschluss von Toxoplasmen mit Triton X-114 und anschließender Zentrifugation lässt sich GRA9 sowohl in der wässrigen als auch in der Triton X-114 Phase nachweisen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das in den DGs enthaltene GRA9 durch hydrophobe und hydrophile Interaktionen stabilisiert wird. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits mit GRA2 (Mercier *et al.*, 1998c) und GRA5 (Lecordier *et al.*, 1999a) erhalten. Vergleichbare Interaktionen wurden auch in DGs von Eukaryonten beschrieben (Colomer *et al.*, 1996).

Im folgenden wurde die Art der Aggregation von GRA9 weiter analysiert. Dazu wurde das mittels der F/T Aufschlussmethode nach Ultrazentrifugation erhaltene Pellet mit Harnstoff (Urea) oder NP40 (Nonidet P40) behandelt und nach erneuter Zentrifugation mittels Western-Blot analysiert. Dabei ergab sich, dass GRA9 sowie GRA2 und GRA5 nur zum Teil durch den Harnstoff vom Pellet gelöst werden können. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass ein Teil des GRA9 über ionische Wechselwirkungen im Aggregat gebunden ist. Ein anderer Teil, der mit Urea nicht aus dem Pellet gelöst werden kann, ist evtl. über hydrophobe Wechselwirkungen aggregiert. Daher wurde eine weitere Untersuchung mit NP-40 angeschlossen, die eine Aufhebung der hydrophoben Wechselwirkungen erlaubt. Tatsächlich konnte mittels NP-40 ein Grossteil des aggregierten GRA9 aus dem Pellet freigesetzt werden. Eine ähnliche Aggregatassoziation ist bereits für GRA5 beschrieben, das sich in ähnlichen Experimenten nahezu völlig durch NP-40 aus dem Pellet lösen lässt (Mercier *et al.*, 2002). Ganz anders als GRA9 und GRA5 verhält sich GRA3. Dieses enthält nur eine Reihe kleiner

hydrophobe Regionen in seiner Aminosäuresequenz und ist in den DG nur in einer freien Form nachweisbar (Ossorio *et al.*, 1994).

Insgesamt ist anzunehmen, dass die Bindung von GRA9 bzw. GRA2 in den Aggregaten hauptsächlich auf die amphiphilen und /oder hydrophoben  $\alpha$ -Helices in den beiden Proteinen zurückzuführen ist. Dies soll später bei der Analyse der Interaktion von GRA9 mit dem Netzwerk in der PV näher diskutiert werden.

Abgesehen von GRA1 und GRA3 kommen die meisten GRA Proteine in den DGs als freie und als aggregierte Proteine vor. Ihre Sekretion in die PV erfolgt jedoch in allen Fällen nur in der freien Form (Sibley *et al.*, 1995; Lecordier *et al.*, 1999). Daher ist anzunehmen, dass auch GRA9 nur in freier Form sezerniert wird.

### **IV.3 Die Sekretion von GRA9 erfolgt am apikalen Pol des Parasiten und ist wahrscheinlich nicht an der Bildung des Netzwerks in der PV beteiligt**

Nach der Invasion der Wirtszelle erfolgt an den Polen des Parasiten die Sekretion der GRA-Proteine innerhalb der ersten 20 Minuten (Carruthers & Sibley, 1997; Dubremetz *et al.*, 1993; Sibley *et al.*, 1995; Labruyere *et al.*, 1999). GRA1, GRA2, GRA4 und GRA6 werden beispielsweise am apikalen Ende des Parasiten sezerniert, verbleiben sehr kurz seitlich am Parasiten und erreichen ihre endgültigen Zielorte ca. eine Stunde nach der Bildung der PV (Carruthers & Sibley, 1997; Dubremetz *et al.*, 1993).

GRA2 und GRA6 sind die einzigen bislang beschriebenen GRA-Proteine (GRA1-8), die transient in den posterioren Invaginationen akkumulieren. Diese Invaginationen enthalten multi-lamellare Vesikel, die später das sogenannte Netzwerk im Lumen der PV bilden (Sibley *et al.*, 1995; Mercier *et al.*, 2002). Das tubulovesikuläre Netzwerk entsteht 10-20 min nach der Invasion am posterioren Ende des Parasiten. Danach entwickelt sich das Netzwerk zu Nanotubulli von 60-90nm Durchmesser, die das Lumen der PV durchziehen. Diese Nanotubulli münden in der Membran der parasitophoren Vakuole. Das durch GRA-Proteine modifizierte Netzwerk ist wahrscheinlich an der intrazellulären Entwicklung des Parasiten beteiligt und trägt zur Vergrößerung der Austauschoberfläche zwischen dem Parasiten und Wirtszelle bei (Karsten *et al.*, 1998).

Die enge Assoziation von GRA2 und GRA6 mit dem Netzwerk und deren Beteiligung an seiner Bildung, wurde an  $\Delta$ GRA2/GRA6 „Doppel-ko“ Mutanten untersucht. Dabei ergab sich, dass bei dieser Mutante die Bildung des Netzwerks fehlerhaft erfolgt. Die gewöhnlich gestreckten multi-lamellaren Vesikel, die sich ausgehend vom posterioren Ende des Parasiten

entwickeln und später das Netzwerk bilden, bleiben in diesem Fall globulär organisiert (Mercier *et al.*, 2002).

Die Analyse der Sekretion von GRA9 mittels IFA ergab, dass GRA9 eher gleichmäßig in der PV verteilt ist. Eine initiale Akkumulation am posterioren Pol konnte nicht gefunden werden. Dies bedeutet, dass GRA9 nicht über die Invagination am posterioren Ende des Parasiten transportiert wird und somit wahrscheinlich nicht am Entstehen des Netzwerkes beteiligt ist.

#### **IV.4 In der PV ist GRA9 mit dem Netzwerk assoziiert**

Obwohl GRA9, wie in den Kinetikuntersuchungen gezeigt, nicht an der Entstehung des Netzwerkes beteiligt ist, war es zu Beginn unserer Untersuchungen wahrscheinlich, dass GRA9 mit dem Netzwerk assoziiert ist.

Obwohl keine Signale für den zielgerichteten Transport von GRA-Proteinen bekannt sind, werden die GRA-Proteine, nach ihrer Sekretion in die PV, zu unterschiedlichen Stellen in der PV gebracht (Charif *et al.*, 1990; Leriche & Dubremetz, 1991):

-GRA1 ist im Lumen der PV zu finden und ist durch eine periphere Interaktion mit dem Netzwerk assoziiert,

-GRA2, GRA4, GRA6 sind ausschließlich mit dem Netzwerk assoziiert,

-GRA3, GRA5, GRA7 und GRA8 interagieren auf unterschiedliche Arten mit der PVM.

Nach unseren Befunden ist GRA9 hauptsächlich an das Netzwerk der PV gebunden. In der Tat wird GRA9, wie elektronenmikroskopische Analysen nach einer kompletten Permeabilisierung der Membranen mit 0,2% Triton-X 100 ergaben (Abbildung 12B/C), nur noch in enger Assoziation mit dem Netzwerk dargestellt, während das Lumen der PV frei von GRA9 ist.

Weitere Analysen von GRA9 durch IFA in Tachyzoiten-infizierten HFF zeigen, dass GRA9 nicht nur an dem Netzwerk zu finden ist, sondern wahrscheinlich auch die innere Seite der PVM dekoriert. Die Bestätigung dieser Beobachtung mittels Elektronenmikroskopie steht aber noch aus.

Obwohl GRA9 wahrscheinlich nicht an der Bildung des Netzwerkes beteiligt ist, ist GRA9 mit dem reifen Netzwerk in der PV assoziiert. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass GRA9 an der Modifikation und Funktion des Netzwerkes beteiligt ist.

#### IV.5 Analyse der Interaktion von GRA9 mit dem Netzwerk

Nach der Sekretion in die PV geht GRA9 eine Interaktion mit dem Netzwerk der PV ein und ist auch an der PVM nachweisbar. Eine ähnliche Verteilung am Netzwerk und an der PVM ist bisher nur für GRA7 beschrieben (Karsten *et al.*, 1998). Die Darstellung der Interaktion von GRA9 mit dem Netzwerk mittels EM ist eindeutig, gibt aber keinen Anhaltspunkt dafür, wie GRA9 mit dem Netzwerk interagiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Art der Bindung von GRA9 an das Netzwerk mittels biochemischer Methoden analysiert. Hierfür wurden mit Tachyzoiten infizierte HFF-Zellen mechanisch von intakten Parasiten befreit und der Inhalt der Vakuole (lösliche und integrale Proteine, Netzwerk und PVM) analysiert. Wie bereits in dieser Arbeit experimentell demonstriert, lässt sich GRA9 in den DG nur teilweise durch Harnstoff solubilisieren. Dagegen kann man mit NP40 ca. 95% des GRA9 aus der Membranfraktion der PV ablösen.

Die Art der Wechselwirkung von GRA-Proteinen mit dem Netzwerk bzw. der PVM ist für die verschiedenen GRA-Proteine sehr unterschiedlich:

-GRA1 enthält keine putative Transmembranregion und ist ein hydrophiles Protein. Nach der Sekretion in die PV verbleibt GRA1 zum großen Teil im Lumen der PV und geht aber auch mit dem Netzwerk eine periphere Interaktion ein. Diese Interaktion von GRA1 mit dem Netzwerk kann durch Behandlung mit Harnstoff gelöst werden (Sibley *et al.*, 1995).

-GRA2 wird durch zwei amphiphile  $\alpha$ -Helices an das Netzwerk gebunden und kann mit NP40 davon gelöst werden (Lecordier *et al.*, 1999). Eine Behandlung mit Harnstoff kann GRA2 nicht aus dem Netzwerk lösen.

-GRA5 ist ein Transmembranprotein, dass in der PVM integriert ist. Es kann ebenfalls nur durch NP40 solubilisiert werden (Lecordier *et al.*, 1999).

Die integralen Membranproteine sind mit mindestens einem Molekülabschnitt in die Phospholipid-Doppelschicht eingebettet. Häufig handelt es sich bei den integralen Membranproteinen gleichzeitig um Transmembranproteine, die die Phospholipid-Doppelschicht völlig durchspannen. Einige integrale Proteine sind allerdings nur in einer der beiden Membranschichten verankert. An diesen Proteinen sind meist Fettsäuren kovalent gebunden, mit denen die Proteine in der Phospholipid-Doppelschicht verankert sind. Integrale Membranproteine werden durch zwei verschiedene Wechselwirkungen in der Membran fixiert:

- 1.) Ionenbindungen zwischen den kovalent gebundenen Lipiden und der polaren Kopfgruppe der Lipide.
- 2.) Hydrophobe Wechselwirkungen im Innenbereich der Doppelschicht

Hydrophobe Wechselwirkungen gehen nicht nur die hydrophoben Bereiche der Transmembrandomänen ein, sondern auch amphiphile und/oder hydrophobe  $\alpha$ -Helices können an hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt sein. Da die GRA9-Sequenz keinen hydrophoben Transmembranbereich enthält, ist es wahrscheinlich, dass die  $\alpha$ -helikalen Bereiche von GRA9 an der Bindung an das Netzwerk beteiligt sind.

Die Analyse der Sekundärstruktur von GRA9 ergab, dass GRA9 eine amphiphile  $\alpha$ -Helix und zwei hydrophobe  $\alpha$ -Helices enthält. Die kleineren hydrophoben Helices im GRA9-Molekül können, ebenso wie die amphiphile Helix, an der Bindung von GRA9 an das Netzwerk beteiligt sein. Besonders interessant ist aber der amphiphile helikale Bereich im GRA9-Protein.

Amphiphile Helices sind auf einer Seite der Helix hydrophil und auf der anderen hydrophob und bilden ein wichtiges Strukturelement bei Proteinen, die in der Zellmembran als Poren oder Kanäle fungieren. Die Wände einer Membranpore bestehen meist aus amphiphilen Helices, deren hydrophobe Seiten gegen die Außenseite der Pore, also zur Lipidmembran, gerichtet sind, während die hydrophilen Seiten zum Inneren der Pore zeigen, wo wasserlösliche Moleküle oder Ionen durch den Kanal hindurchtreten können.

Der amphiphile  $\alpha$ -Helix-Abschnitt von GRA9 besteht aus 20 AS, ist also ca. 3 nm lang und reicht daher gerade aus, um den Kohlenwasserstoffkern der Phospholipid-Doppelschicht zu durchqueren. Die Integration von GRA9 in dem Netzwerk durch seine amphiphile Helix könnte also zur Bildung einer Membranpore beitragen.

Die amphiphile und die hydrophoben  $\alpha$ -Helices von GRA9 könnten dessen Interaktion mit dem Netzwerk und mit der PVM erklären. Ferner besteht die Möglichkeit, dass GRA9 über andere Proteine (z.B. andere GRA-Proteine) indirekte Interaktionen mit Membranen der Vakuole (Netzwerk und PVM) eingeht. Potentielle Interaktionspartner sind z.B. GRA2, das mit dem Netzwerk und GRA5, das mit der PVM interagiert.

Dies erscheint nach den hier vorgelegten Ergebnissen jedoch unwahrscheinlich, denn es konnte gezeigt werden, dass weder GRA2 noch GRA5 unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit GRA9 kopräzipitieren. Interaktionsstudien mit weiteren GRA-Proteinen (GRA4 und GRA6 für das Netzwerk; GRA3, GRA5, GRA7 und GRA8 für die PVM) wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt und können daher z.Zt. noch nicht ausgeschlossen werden.

#### **IV.6 GRA9 wird in Bradyzoiten exprimiert**

GRA9 ist mit dem Netzwerk der reifen parasitophoren Vakuole assoziiert, von dem man annimmt, dass es für das Überleben des Parasiten wichtig ist. Ein vergleichbares Netzwerk findet man auch innerhalb der Gewebszysten von *Toxoplasma gondii*. Diese Gewebszysten sind mit Bradyzoiten, der nur langsam replizierenden Form des Parasiten, gefüllt. Es war daher interessant zu untersuchen, ob GRA9 auch in Toxoplasmazysten nachweisbar ist.

Im Elektronenmikroskop unterscheiden sich die Bradyzoiten von den bisher analysierten Tachyzoiten durch eine erhöhte Anzahl an Mikronemen, durch elektronendichte Rhoptrien, durch die Akkumulation von Amylopektin Granula (fehlt bei Tachyzoiten völlig) und durch den Kern, der eher posterior lokalisiert ist. Im Gegensatz zu Tachyzoiten, die sich innerhalb einer PV entwickeln, befinden sich die Bradyzoiten in einer echten Zyste, welche von einem Zystenwall umgeben ist. Die Bradyzoiten charakterisieren die chronische Phase der Toxoplasmose (Coppin *et al.*, 2003).

Die meisten bisher beschriebenen GRA-Proteine findet man sowohl in Tachy- als auch in Bradyzoiten. In Bradyzoiten werden die GRA-Proteine (GRA1-7) exprimiert (Ferguson *et al.*, 1999), für die Expression von GRA8 in Bradyzoiten gibt es bisher noch keinen Beweis. Die NTPase, ein weiteres GRA-Protein, ist in Bradyzoiten nicht nachweisbar (Nakaar *et al.*, 1998; Silverman *et al.*, 1998).

Durch doppelte Immunfluoreszenz-Analysen wird im Rahme dieser Arbeit belegt, dass GRA9 sowohl in Tachyzoiten- als auch in Bradyzoitenstadien exprimiert wird. Eine weitergehende, genaue Lokalisation von GRA9 innerhalb der Zyste wurde bisher nicht durchgeführt. Obwohl viele GRA-Proteine innerhalb der Zysten nachweisbar sind, ist das genaue Gen-Expressionsprofil dieser Proteine noch weitestgehend unbekannt. Nur Cleary *et al.* haben beschrieben (2002), dass die Transkriptionsrate der verschiedenen GRA-Proteine in den verschiedenen Stadien (Tachyzoiten vs. Bradyzoiten) unterschiedlich ist. Eine genaue Analyse dieser Transkriptionsunterschiede könnte weitere Erkenntnisse über die Funktion der GRA-Proteine in den Bradyzoiten liefern.

#### **IV.7 Funktionelle Charakterisierung von GRA9**

Die Definition der Bedeutung von GRA9 für *T. gondii* war eines der Hauptziele dieser Arbeit. Angesichts der Lokalisierung der GRA-Proteine an verschiedenen Stellen in der PV (Lumen, Netzwerk und PVM), also in dem Kompartiment zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle, lässt sich schließen, dass die GRA-Proteine möglicherweise Aufgaben bei der Interaktion

zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle übernehmen. Dabei fallen den einzelnen GRA-Proteinen wahrscheinlich verschiedene Aufgaben zu:

- Porenbildung in der PVM bzw. dem Netzwerk, die am Elektrolyten-, Nahrungs- oder Abfallaustausch zwischen Wirtszelle und Parasit beteiligt sind
- Signaltransduktion
- Enzymaktivität
- Rezeptorfunktion

Die aus Aminosäuresequenzanalysen erhaltenen Strukturvorhersagen und die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von GRA9 zu.

In der PV ist GRA9 wie GRA2 in das Netzwerk integriert. Diese Integration kann durch die N-terminal gelegenen amphiphilen  $\alpha$ -Helices erfolgen. Die amphiphilen  $\alpha$ -Helices sind dafür bekannt, dass sie nicht nur die Membranintegration von Proteinen ermöglichen, sondern auch Poren oder Kanäle in Membranen bilden können.

Auch posttranslationale Modifikationen können Hinweise auf die Funktion eines Moleküls liefern, so ist z.B. für *Toxoplasma gondii* beschrieben, dass nahezu alle Oberflächenproteine glykosyliert sind. Innerhalb der GRA Proteinfamilie wurde bisher nur GRA2 als Glykoprotein beschrieben. Das GRA9 Molekül besitzt vier potentielle Glykosylierungsstellen, deren Nutzung auf die Funktion als Rezeptormolekül hindeuten könnte. Für den Nachweis der Glykosylierung wurde die nichtselektive Glykoproteinfärbung nach der modifizierten Methode von Heimgartner (Heimgartner *et al.*, 1989) verwendet. Dabei werden die auf Nitrocellulose-Membran transferierten Glykoproteine mit Periodat oxidiert und die entstandenen Aldehydgruppen mit Polyhydraziden und danach mit Periodat-oxidiertes Periodase umgesetzt. Die Methode erfasst Submikrogramm-Mengen von Glykoproteinen und zeigt, dass es sich bei GRA9 wahrscheinlich nicht um ein Glykoprotein handelt (Abbildung 15).

Eine Glykosylierung von GRA9 konnte mit der hier angewendeten Methode also nicht bestätigt werden. Eine Fehlermöglichkeit wäre aber z.B. die Glykosylierung mit nur einer geringen Anzahl an frei oxidierbaren Zuckern, die ebenfalls zu einem negativen Ergebnis führen kann.

Als weitere posttranslationale Modifikation wurde die Phosphorylierung von GRA9 analysiert. Dabei ergab sich, dass GRA9 sogar an mehreren Stellen phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von GRA9 erfolgt eher in der Mitte des Proteins und in geringerem Ausmaß auch im C-terminalen Bereich. Der N-terminale Bereich, in dem die amphiphile  $\alpha$ -Helix lokalisiert ist, die möglicherweise an der Integration von GRA9 an das Netzwerk

beteiligt ist, weist keine Phosphorylierungsstelle auf. Die hohe Phosphorylierungsrate (20 Phosphorylierungsstellen) von GRA9 kann auf einen biologischen Aktivierungsprozess hindeuten. Die Proteinphosphorylierung könnte beispielsweise zum An- und Abschalten von Enzymaktivitäten verwendet werden.

Die Phosphorylierung von Proteinen erfolgt überwiegend an *Ser/Thr-Resten* und *Tyr-Resten*. Die Phosphorylierung eines Proteins ist eine spezifische enzymatische Reaktion, bei der einem Protein, das als Substrat dient, eine spezifische Proteinkinase zugeordnet ist. Die Proteinkinasen sind Phosphotransferasen, die die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf eine Akzeptor-Aminosäure im Substratprotein katalysieren. Das Produkt der Proteinphosphorylierung ist ein Phosphatester, der bei neutralem pH-Wert zwei negativen Ladungen trägt. Von einem ungeladenen Aminosäurerest ausgehend werden durch die Phosphorylierung zwei zusätzliche negative Ladungen im Substratprotein erzeugt. Die Änderung des Ladungszustands des Proteins in definierten Strukturbereichen ist der entscheidende Aspekt der Proteinphosphorylierung, wobei viele Wege denkbar und auch verwirklicht sind, durch die eine Phosphorylierung die Aktivität eines Proteins verändern und regulieren kann.

Molekulare Informationen zur Auswirkung der Phosphorylierung auf die Struktur und Aktivität von Proteinen liegen für verschiedene Enzyme vor, z.B.: die Glykogen-Phosphorylase des Muskels und für die Isocitratdehydrogenase aus *E. coli*. Die beiden Beispiele repräsentieren zwei sehr unterschiedliche Mechanismen, nach denen eine enzymatische Aktivität durch Proteinphosphorylierung gesteuert werden kann. Bei der Glykogen-Phosphorylase kommt es als Folge der Phosphorylierung zu weitreichenden allosteren Konformationsänderungen. Bei der Isocitratdehydrogenase erfolgt die Phosphorylierung dagegen direkt in der Substratbindungsstelle und verhindert die Substratbindung ohne dass dies größere Konformationsänderungen bedingt.

Die Phosphorylierung ist ein entscheidender Schritt bei der Regulation von Enzymaktivitäten, und wie bereits erwähnt hat GRA9 eine 46% Homologie (Aminosäuresequenz) zu der Farnesyltransferase (Squalen Synthase) der Maus. Die Farnesyltransferase ist eines der Schlüsselenzyme der Cholesterol-Biosynthese, wobei zwei Moleküle Farnesylpyrophosphat miteinander verknüpft werden. Es entsteht dann ein Molekül Squalen, welches durch Zyklisierung Cholesterol bildet. Die Lokalisierung von GRA9 an der inneren Seite der PVM könnte als Hinweis auf eine Beteiligung von GRA9 am Lipidmetabolismus gewertet werden. Denn die PVM ist über die sogenannte „PVM-Organell-Assoziation“- mit dem Wirtszell-ER und den Mitochondrien verbunden. Die schnell

replizierenden Parasiten und die Erweiterung der PVM bedingen eine schnelle Membranbiosynthese, die sehr viel Energie benötigt und von dem Vorhandensein von Lipidvorläufermolekülen abhängig ist. In weiteren Arbeiten soll in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. R. Schwarz (Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Marburg) geklärt werden, ob GRA9 tatsächlich eine Farnesyltransferaseaktivität aufweist.

Neben den geschilderten Zugängen zur möglichen Funktion von GRA9 *in vivo*, die alle auf von der Molekülstruktur abgeleiteten Prognosen beruhen, wurden in dieser Arbeit auch zwei direkte Zugänge zur Analyse der Funktion von GRA9 durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein GRA9-Expressionsvektor in die Toxoplasmen eingeführt, und damit eine Überexpression von GRA9 in den Toxoplasmen verursacht. In einem weiteren Ansatz wurde das Gen für GRA9 durch homologe Rekombination ausgeschaltet.

Es ließ sich eindeutig zeigen, dass die Überexpression von GRA9 keinen Einfluss auf die Viabilität und Replikation der Toxoplasmen hat. Außerdem beeinträchtigt die Modifikation des GRA9 durch dessen Fusion mit dem sogenannten myc-tag den sekretorischen Transportweg. Die Verteilungsmuster von GRA9-myc in der PV ähnelt dem des nativen GRA9. Dies ist nicht selbstverständlich, denn in der Literatur ist bereits beschrieben, dass schon kleine Veränderungen der Sequenz oder auch nur ein Basenaustausch in der Sequenz einzelner „dense granules“-Proteine deren Aggregations- und Sekretionsvermögen deutlich beeinflussen können. So ist z.B bekannt, dass das Wachstumshormon R183H in der Maus-Zelllinie AtT20 in Aggregatform in DG gelagert wird. Wird das R183H jedoch als Fusionsprotein mit myc exprimiert, so ist dessen Sekretion deutlich gestört. Ein anderes Protein, das Hämagglutinin (ebenfalls ein sekretorisches Protein, bildet aber in den DG keine Aggregate), wird nach Expression als Fusionsprotein mit myc ungestört exprimiert und sezerniert (Deladoey *et al.*, 2001).

Ein weiterer Weg zur Analyse der Bedeutung eines Proteins für einen Organismus ist die Herstellung funktioneller „Knock out“ Mutanten. Die für *T. gondii* etablierte Methode zur Herstellung von „Knock out“ Mutanten basiert auf der homologen Rekombination- bzw. „Crossing over“-Technologie, wobei ganze Genblöcke ausgetauscht werden können. Eine Besonderheit bei Toxoplasmen ist, dass für eine erfolgreiche Anwendung dieser Methode große flankierende Regionen des auszuschaltenden Gens bei der Konstruktion des Zielsvektors benötigt werden.

Die für GRA9-„Knock out“ Erzeugung erforderlichen flankierenden Regionen wurden in Rahmen dieser Arbeit erfolgreich mittels „Genome walking“ isoliert. Diese flankierenden Regionen wurden anschließend für die Konstruktion des Zielvektors verwendet, wobei der

GRA9-Genlokus durch das für den Selektionsmarker kodierende Gen (Bleomycin kodierendes Gen) ausgetauscht wurde. In diesem Zielvektor umgeben die früher das GRA9-Gen flankierenden Regionen nun das Gen für die Bleomycin-Resistenz. Mittels dieses Zielvektors konnten in Rahmen dieser Arbeit erfolgreich GRA9 defiziente Mutanten hergestellt werden. Obwohl die gründliche phänotypische Untersuchungen der GRA9-defizienten Mutanten noch nicht abgeschlossen ist, wurde eine Besonderheit der GRA9-k.o. Mutanten gefunden.

Insgesamt wurden 12 Transformationen durchgeführt, in allen Ansätzen konnte ein Anteil von ca. 15% k.o Mutanten mittels IFA nachgewiesen werden. Aus 6 dieser Transformationen konnten 14 GRA9-k.o.-Klone isoliert werden. Von diesen 14 Klonen wurden 5 Klone weiter charakterisiert und kultiviert. Dabei fiel auf, dass keiner dieser Klone länger als ca. 4 Wochen (4-8 Wirtszellpassagen) kultivierbar war. Das Absterben der Klone ca. 4 Wochen nach der Klonierung ist nicht auf die Wirkung von Bleomycin zurückzuführen. Auch in der Abwesenheit dieses Antibiotikums sterben die Klone mit einer ähnlichen Kinetik ab. In zukünftigen Experimenten soll die Tatsache ausgenutzt werden, das GRA9 in Toxoplasmen ohne eine Beeinflussung der Vitalität des Parasiten mittels eines Expressionvektors, überexprimiert werden kann. Es ist geplant die GRA9-k.o.-Mutanten mit diesem Expressionsvektor zu transfizieren, und auf diese Weise eine funktionelle GRA9-knock-in-Mutante zu erzeugen.

Überraschend bei der Arbeit mit den GRA9-k.o.-Mutanten ist aber, dass die Ausgangspopulation, die für die Klonierung benutzt wurde, kontinuierlich kultivierbar ist, und auch nach Monaten noch einen Anteil von ca.15% an „Knock out“ Mutanten enthält.

Daraus kann man schlussfolgern, dass es sich bei der Ausschaltung von GRA9 um eine letale Mutation handelt. Auffallend aber ist, dass verzögerte Absterben der GRA9-k.o.-Klone. Dies könnte evt. dadurch erklärt werden, dass andere Proteine den Funktionsausfall durch die GRA9-Defizienz zumindest teilweise kompensieren, dies aber nicht auf Dauer leisten können. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass es sich bei dem seit einigen Jahren bekannten Genprodukt B10 um ein neues Mitglied der GRA-Proteinfamilie handelt. Dieses stark phosphorylierte Protein ist innerhalb des Parasiten in den „dense granules“ nachweisbar. Es ließ sich zeigen, dass GRA9 innerhalb der parasitophoren Vakuole hauptsächlich an Strukturen des Netzwerks gebunden vorkommt. Für die Interaktion von GRA9 mit den membranösen Bestandteilen des Netzwerks sind wahrscheinlich amphiphile und hydrophobe  $\alpha$ -helikale Bereiche innerhalb des GRA9-Proteins verantwortlich. Funktionell ist GRA9 für das Überleben der Toxoplasmen innerhalb der parasitophoren Vakuole von großer

Bedeutung. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass GRA9-defiziente Parasiten nicht auf Dauer überleben können.

## V. Zusammenfassung

Innerhalb des Stammes der Apicomplexa, ist *Toxoplasma gondii* der am häufigsten zur Analyse biologischer Fragestellungen verwendete Parasit. Dies ist zum Teil auf die einfache *in vitro* Kultivierbarkeit und andererseits auf das relativ stabile Genom des Parasiten zurückzuführen. Die EST Datenbank von *T. gondii* enthält mehr als 10.000 Sequenzen, die größtenteils noch nicht charakterisiert wurden. Zu diesen gehörte auch das in dieser Arbeit beschriebene B10 Gen.

Mittels Immunfluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie konnte das B10-Protein eindeutig in den „dense granules“ lokalisiert werden. Das B10-Protein wurde dadurch als ein neues Mitglied der Familie der „dense granules“ Proteine (GRA-Proteine) erkannt und erhielt die systematische Bezeichnung GRA9. GRA9 wird, wie alle bislang beschriebenen GRA-Proteine, sowohl in Tachyzoiten (Vermehrungsform) als auch in Bradyzoiten (Dauerstadium) synthetisiert. Weitere Analysen ergaben, dass das GRA9-Protein nicht glykosyliert aber posttranslational phosphoryliert wird.

GRA9 wird, wie alle bekannten GRA-Proteine, in die parasitophore Vakuole (PV) sekretiert. Die Reifung der PV zu einer Austauschplattform zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle ist wahrscheinlich die Hauptaufgabe der GRA-Proteine. Die detaillierte Darstellung von GRA9 in der PV mittels Elektronenmikroskopie zeigte dessen Assoziation mit dem membranösen Netzwerk, einer im Lumen der PV befindlichen tubulovesikulären Struktur. Die Analysen zur Assoziation von GRA9 mit dem Netzwerk mittels subzellulärer Fraktionierungsmethoden lassen auf dessen mögliche integrale Bindung an das Netzwerk schließen. Diese Insertion ist vermutlich auf das Vorhandensein einer amphiphilen  $\alpha$ -Helix im N-terminalen Bereich des GRA9-Proteins zurückzuführen.

Neben der biochemischen Analyse von GRA9 wurden auch GRA9 Mutanten hergestellt und funktionell charakterisiert. Dabei wurde gefunden, dass eine Überexpression von GRA9 in *T. gondii* dessen intrazelluläre Replikation nicht beeinflusst. Auffallend war aber, dass GRA9-knock-out-Mutanten nur einige Wochen (ca. 4 Wochen) überleben können. Dieses verzögerte Absterben lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass andere Proteine den GRA9-Verlust teilweise, aber nicht auf Dauer kompensieren können. GRA9 scheint somit essentiell für *T. gondii* zu sein und nimmt in dieser Hinsicht eine Sonderstellung ein, da bisher für GRA-Protein-Mutanten eine letale Wirkung noch nicht beschrieben worden ist.

## VI. Referenzen

- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D., & Dubremetz, J. F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 103 Pt 3, 321-329.
- Ajioka, J. W. (1998). *Toxoplasma gondii*: ESTs and gene discovery. *Int.J.Parasitol.* 28, 1025-1031.
- Allan, B. B. & Balch, W. E. (1999). Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science* 285, 63-66.
- Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O., & Joiner, K. A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J.Cell Biol.* 127, 947-961.
- Bermudes, D., Dubremetz, J. F., Achbarou, A., & Joiner, K. A. (1994). Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 68, 247-257.
- Bermudes, D., Peck, K. R., Afifi, M. A., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J.Biol.Chem.* 269, 29252-29260.
- Black, M. W. & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64, 607-623.
- Bordier, C. (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J.Biol.Chem.* 256, 1604-1607.
- Bradley, P. J. & Boothroyd, J. C. (2001). The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Int.J.Parasitol.* 31, 1177-1186.
- Brecht, S., Carruthers, V. B., Ferguson, D. J., Giddings, O. K., Wang, G., Jakle, U., Harper, J. M., Sibley, L. D., & Soldati, D. (2001). The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J.Biol.Chem.* 276, 4119-4127.
- Brossier, F., Jewett, T. J., Lovett, J. L., & Sibley, L. D. (2003). C-terminal processing of the toxoplasma protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *J.Biol.Chem.* 278, 6229-6234.

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

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

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

Carruthers, V. B., Moreno, S. N., & Sibley, L. D. (1999). Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca<sup>2+</sup>] and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Biochem.J.* 342 ( Pt 2), 379-386.

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

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

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

Cesbron-Delauw, M. F. & Capron, A. (1993). Excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*--their origin and role in the host-parasite interaction. *Res.Immunol.* 144, 41-44.

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

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

Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P. I., Striepen, B., Roos, D. S., & Joiner, K. A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J.Biol.Chem.* 274, 2424-2431.

- Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* 47, 45-148.
- Colomer, V., Kicska, G. A., & Rindler, M. J. (1996). Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. *J.Biol.Chem.* 271, 48-55.
- Coppens, I., Andries, M., Liu, J. L., & Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. *Eur.J.Cell Biol.* 78, 463-472.
- Coppin, A., Dzierszinski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Ferguson, D., & Tomavo, S. (2003). Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie* 85, 353-361.
- Cornelissen, A. W., Overdulve, J. P., & van der, P. M. (1984). Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology* 88 ( Pt 3), 531-553.
- Dannies, P. (2003). Manipulating the reversible aggregation of protein hormones in secretory granules: potential impact on biopharmaceutical development. *BioDrugs.* 17, 315-324.
- Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V., & Capron, A. (1988). Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 10, 553-567.
- Darcy, F., Maes, P., Gras-Masse, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslee, D., Godard, I., Cesbron, M. F., Tartar, A., & Capron, A. (1992). Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J.Immunol.* 149, 3636-3641.
- Deladoey, J., Stocker, P., & Mullis, P. E. (2001). Autosomal dominant GH deficiency due to an Arg183His GH-1 gene mutation: clinical and molecular evidence of impaired regulated GH secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86, 3941-3947.
- Desmots, G. & Couvreur, J. (1974). Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N.Engl.J.Med.* 290, 1110-1116.

Dobrowolski, J. M., Niesman, I. R., & Sibley, L. D. (1997). Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil.Cytoskeleton* 37, 253-262.

Dobrowolski, J. M. & Sibley, L. D. (1996). Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84, 933-939.

Donald, R. G., Carter, D., Ullman, B., & Roos, D. S. (1996). Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J.Biol.Chem.* 271, 14010-14019.

Donald, R. G. & Roos, D. S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 11703-11707.

Donald, R. G. & Roos, D. S. (1994). Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase locus in *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 63, 243-253.

Donald, R. G. & Roos, D. S. (1995). Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 5749-5753.

Dubey, J. P. (1998). Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. *J.Parasitol.* 84, 1279-1282.

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin.Microbiol.Rev.* 11, 267-299.

Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., & Joiner, K. A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol.Res.* 79, 402-408.

Dubremetz, J. F. & Schwartzman, J. D. (1993). Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res.Immunol.* 144, 31-33.

Dynan, W. S., Saffer, J. D., Lee, W. S., & Tjian, R. (1985). Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 4915-4919.

Endo, T., Sethi, K. K., & Piekarski, G. (1982). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp.Parasitol.* 53, 179-188.

Entzeroth, R., Kerckhoff, H., & Konig, A. (1992). Microneme secretion in Coccidia: confocal laser scanning and electron microscope study of *Sarcocystis muris* in cell culture. *Eur.J.Cell Biol.* 59, 405-413.

Ferguson, D. J., Cesbron-Delauw, M. F., Dubremetz, J. F., Sibley, L. D., Joiner, K. A., & Wright, S. (1999). The expression and distribution of dense granule proteins in the enteric (Coccidian) forms of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Exp.Parasitol.* 91, 203-211.

Fichera, M. E. & Roos, D. S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407-409.

Fischer, H. G., Nitzgen, B., Reichmann, G., Gross, U., & Hadding, U. (1997). Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol.Res.* 83, 637-641.

Fischer, H. G., Stachelhaus, S., Sahn, M., Meyer, H. E., & Reichmann, G. (1998). GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol.Biochem.Parasitol.* 91, 251-262.

Frixione, E., Mondragon, R., & Meza, I. (1996). Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. *Cell Motil.Cytoskeleton* 34, 152-163.

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

Hager, K. M., Striepen, B., Tilney, L. G., & Roos, D. S. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J.Cell Sci.* 112 ( Pt 16), 2631-2638.

Hakansson, S., Morisaki, H., Heuser, J., & Sibley, L. D. (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.

Heimgartner, U., Kozulic, B., & Mosbach, K. (1989). Polyacrylic polyhydrazides as reagents for detection of glycoproteins. *Anal.Biochem.* 181, 182-189.

Hettmann, C., Herm, A., Geiter, A., Frank, B., Schwarz, E., Soldati, T., & Soldati, D. (2000). A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Mol.Biol.Cell* 11, 1385-1400.

Hu, K., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J.Cell Biol.* 156, 1039-1050.

Hu, S., Schwartzman, J. D., & Kasper, L. H. (2001). Apoptosis within mouse eye induced by *Toxoplasma gondii*. *Chin Med.J.(Engl.)* 114, 640-644.

Huynh, M. H., Rabenau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L., Sibley, L. D., & Carruthers, V. B. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO J.* 22, 2082-2090.

Jewett, T. J. & Sibley, L. D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol.Cell* 11, 885-894.

Joiner, K. A., Fuhrman, S. A., Miettinen, H. M., Kasper, L. H., & Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249, 641-646.

Joiner, K. A. & Roos, D. S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J.Cell Biol.* 157, 557-563.

Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., & Beck, E. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 285, 1573-1576.

Jones, T. C. & Hirsch, J. G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J.Exp.Med.* 136, 1173-1194.

Kaasch, A. J. & Joiner, K. A. (2000). Protein-targeting determinants in the secretory pathway of apicomplexan parasites. *Curr.Opin.Microbiol.* 3, 422-428.

Karsten, V., Qi, H., Beckers, C. J., Reddy, A., Dubremetz, J. F., Webster, P., & Joiner, K. A. (1998). The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J.Cell Biol.* 141, 1323-1333.

- Kayser, K., Zeilinger, C., Zeng, F. Y., Gabius, S., Gabius, H. J., & Weiser, W. Y. (1993). Detection of the lymphokine migration inhibitory factor in normal and disease-affected lung by antibody and by its major binding protein, the interferon antagonist sarcolectin. *Pathol.Res.Pract.* 189, 992-995.
- Kim, K., Soldati, D., & Boothroyd, J. C. (1993). Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* 262, 911-914.
- Knoll, L. J. & Boothroyd, J. C. (1998). Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Mol.Cell Biol.* 18, 807-814.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157, 105-132.
- Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C., & Sibley, L. D. (1999). Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 102, 311-324.
- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol.Biol.Cell* 10, 1277-1287.
- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol.Biol.Cell* 10, 1277-1287.
- Lecordier, L., Moleon-Borodowsky, I., Dubremetz, J. F., Tourvieille, B., Mercier, C., Deslee, D., Capron, A., & Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol.Biochem.Parasitol.* 70, 85-94.
- Leriche, M. A. & Dubremetz, J. F. (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol.Res.* 76, 559-562.
- Leriche, M. A. & Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol.Biochem.Parasitol.* 45, 249-259.
- Levine, N. D. (1987). The number of species of rodent coccidia and of other protozoa. *J.Protozool.* 34, 362-363.

- Lingelbach, K. & Joiner, K. A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J.Cell Sci.* 111 ( Pt 11), 1467-1475.
- Luft, B. J. & Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin.Infect.Dis.* 15, 211-222.
- Meissner, M., Schluter, D., & Soldati, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* 298, 837-840.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., & Sibley, L. D. (1998). The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J.Cell Sci.* 111 ( Pt 15), 2171-2180.
- Mercier, C., Dubremetz, J. F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M. F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol.Biol.Cell* 13, 2397-2409.
- Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Deslee, D., Murray, A., Tourvieille, B., Maes, P., Capron, A., & Cesbron-Delauw, M. F. (1993). Molecular characterization of a dense granule antigen (Gra 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 58, 71-82.
- Mercier, C., Lefebvre-Van Hende, S., Garber, G. E., Lecordier, L., Capron, A., & Cesbron-Delauw, M. F. (1996). Common cis-acting elements critical for the expression of several genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol.Microbiol.* 21, 421-428.
- Mercier, C., Rauscher, B., Lecordier, L., Deslee, D., Dubremetz, J. F., & Cesbron-Delauw, M. F. (2001). Lack of expression of the dense granule protein GRA5 does not affect the development of *Toxoplasma* tachyzoites. *Mol.Biochem.Parasitol.* 116, 247-251.
- Mitchell, P. J. & Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., & Sibley, L. D. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J.Exp.Med.* 190, 1783-1792.
- Morrisette, N. S., Bedian, V., Webster, P., & Roos, D. S. (1994). Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. *Exp.Parasitol.* 79, 445-459.

- Nakaar, V., Beckers, C. J., Polotsky, V., & Joiner, K. A. (1998). Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *Mol.Biochem.Parasitol.* 97, 209-220.
- Nakaar, V., Ngo, E. O., & Joiner, K. A. (2000). Selection based on the expression of antisense hypoxanthine-xanthine-guanine-phosphoribosyltransferase RNA in *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 110, 43-51.
- Nakaar, V., Samuel, B. U., Ngo, E. O., & Joiner, K. A. (1999). Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *J.Biol.Chem.* 274, 5083-5087.
- Ngo, H. M., Hoppe, H. C., & Joiner, K. A. (2000). Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends Cell Biol.* 10, 67-72.
- Nichols, B. A. & Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J.Protozool.* 34, 217-226.
- Nockemann, S., Dlugonska, H., Henrich, B., Kitzerow, A., & Daubener, W. (1998). Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen (ESA) from *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 97, 109-121.
- Opitz, C. & Soldati, D. (2002). 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol.Microbiol.* 45, 597-604.
- Ossorio, P. N., Dubremetz, J. F., & Joiner, K. A. (1994). A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J.Biol.Chem.* 269, 15350-15357.
- Porchet-Hennere, E. & Nicolas, G. (1983). Are rhoptries of Coccidia really extrusomes? *J.Ultrastruct.Res.* 84, 194-203.
- Radke, J. R., Striepen, B., Guerini, M. N., Jerome, M. E., Roos, D. S., & White, M. W. (2001). Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 115, 165-175.
- Radke, J. R. & White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol.Biochem.Parasitol.* 94, 237-247.
- Reiss, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M. N., Soete, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J. F., & Soldati, D. (2001). Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *J.Cell Biol.* 152, 563-578.

- Roberts, R. J. (1979). Directory of restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* 68, 27-41.
- Roos, D. S., Donald, R. G., Morrissette, N. S., & Moulton, A. L. (1994). Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol.* 45, 27-63.
- Saffer, L. D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J. F., & Schwartzman, J. D. (1992). Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* 39, 526-530.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 509-513.
- Seeber, F. & Boothroyd, J. C. (1996). *Escherichia coli* beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene* 169, 39-45.
- Sever, J. L., Ellenberg, J. H., Ley, A. C., Madden, D. L., Fuccillo, D. A., Tzan, N. R., & Edmonds, D. M. (1988). Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23,000 pregnancies. *Pediatrics* 82, 181-192.
- Sibley, L. D., Hakansson, S., & Carruthers, V. B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr. Biol.* 8, R12-R14.
- Sibley, L. D. & Howe, D. K. (1996). Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219, 3-15.
- Sibley, L. D., LeBlanc, A. J., Pfefferkorn, E. R., & Boothroyd, J. C. (1992). Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics* 132, 1003-1015.
- Sibley, L. D., Messina, M., & Niesman, I. R. (1994). Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 5508-5512.
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Asai, T., & Takeuchi, T. (1994). *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* 79, 301-311.

- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F., & Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J.Cell Sci.* 108 ( Pt 4), 1669-1677.
- Sibley, L. D., Weidner, E., & Krahenbuhl, J. L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315, 416-419.
- Silverman, J. A., Qi, H., Riehl, A., Beckers, C., Nakaar, V., & Joiner, K. A. (1998). Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *J.Biol.Chem.* 273, 12352-12359.
- Sinai, A. P., Webster, P., & Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J.Cell Sci.* 110 ( Pt 17), 2117-2128.
- Soldati, D. (1996). Molecular genetic strategies in *Toxoplasma gondii*: close in on a successful invader. *FEBS Lett.* 389, 80-83.
- Soldati, D. & Boothroyd, J. C. (1993). Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* 260, 349-352.
- Stokkermans, T. J., Schwartzman, J. D., Keenan, K., Morrissette, N. S., Tilney, L. G., & Roos, D. S. (1996). Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Exp.Parasitol.* 84, 355-370.
- Striepen, B., Crawford, M. J., Shaw, M. K., Tilney, L. G., Seeber, F., & Roos, D. S. (2000). The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J.Cell Biol.* 151, 1423-1434.
- Striepen, B., He, C. Y., Matrajt, M., Soldati, D., & Roos, D. S. (1998). Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 92, 325-338.
- Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J. F., & Roos, D. S. (2001). Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 113, 45-53.
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., & Ward, G. E. (1996). Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 8413-8418.

- Swedlow, J. R., Hu, K., Andrews, P. D., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). Measuring tubulin content in *Toxoplasma gondii*: a comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 2014-2019.
- Tanford, C., Nozaki, Y., Reynolds, J. A., & Makino, S. (1974). Molecular characterization of proteins in detergent solutions. *Biochemistry* 13, 2369-2376.
- Tenant-Flowers, M., Boyle, M. J., Carey, D., Marriott, D. J., Harkness, J. L., Penny, R., & Cooper, D. A. (1991). Sulphadiazine desensitization in patients with AIDS and cerebral toxoplasmosis. *AIDS* 5, 311-315.
- Tomley, F. M., Bumstead, J. M., Billington, K. J., & Dunn, P. P. (1996). Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 79, 195-206.
- Vaidya, A. B., Akella, R., & Suplick, K. (1989). Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Mol.Biochem.Parasitol.* 35, 97-107.
- van der, Z. E. & Piekarski, G. (1967). [Endodyogeny in *Toxoplasma gondii*. A morphological analysis]. *Z.Parasitenkd.* 29, 15-35.
- Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Braekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E., & Verschueren, H. (2000). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect.Immun.* 68, 38-45.
- Wallace, G. D. (1972). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by cockroaches. *J.Infect.Dis.* 126, 545-547.
- Wan, K. L., Carruthers, V. B., Sibley, L. D., & Ajioka, J. W. (1997). Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol.Biochem.Parasitol.* 84, 203-214.
- Wong, S. Y. & Remington, J. S. (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 7, 299-316.
- Zenner, L., Darcy, F., Capron, A., & Cesbron-Delauw, M. F. (1998). *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp.Parasitol.* 90, 86-94.

**VII. Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenosin
A260	Absorption bei 260 nm
A280	Absorption bei 280 nm
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cat	Chloramphenicolacetyltransferase
Ci	Curie
Cy <sup>2</sup>	Cyanine
Cy <sup>3</sup>	Indocarbocyanine
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochlorid hydrate
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytodintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EST	„expressed sequence tag“
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Guanosin
gDNA	genomische DNA
GRA	„dense granule“
GSCN	Guanidinium-Isothiocyanat
GTP	Guanosintetraphosphat
HP	Horseradish Peroxidase

---

HSP	“high-speed-pellet”
HSS	“high-speed-supernant”
HXGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
LDH	Lactatdehydrogenase
LSP	“low-speed-pellet”
LSS	“low-speed-supernant”
MHC	„major histocompatibility complex”
MIC	Micronemenprotein
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline”
PCR	Polymerasekettenreaktion
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuole Membran
ROP	Rhoptrienprotein
RT	Raumtemperatur
SAG	„surface antigen”
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SSC	„Sodium Saline Citrate”
STI	Soybean Trypsin Inhibitor
T	Thymidin
TBE	Tris Borat EDTA
TCA	Trichloroacetic acid
TE	Tris EDTA
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin
TLA	Toxoplasmalysat
TLR	„toll-like receptor”
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

---

U	Uracil
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

## VIII. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Walter Däubener für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung sowie seine stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst danke ich für anregende Diskussionen und die Vertretung der Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.

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

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Däubener möchte ich dafür danken, dass ich die letzten drei Jahre in einem sehr guten Arbeitsklima verbringen konnte. Ferner danke ich allen anderen Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit und den einen oder anderen guten Rat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Corinne Mercier für wertvolle Tipps, für die Einführung in die Welt der Toxoplasmenforschung, für ihre angenehme Mitarbeit und für die gastfreundliche Aufnahme in Grenoble (Frankreich).

Frau Dr. Dominique Soldati danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Transfektion von Toxoplasmen und für die Bereitstellung von Kontroll-Antikörpern.

Herr Dr. J.-F. Dubremetz (Montpellier, Frankreich), danke ich für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Frau PD. Dr. Gaby Reichmann (Medizinische Mikrobiologie, Düsseldorf) danke ich für die Isolierung der *T. gondii*-Zysten und für die angenehme Mitarbeit.

Frau Dr. Sandra Beer und Frau Dr. Miriam Hopfe danke ich für ihre anregenden Diskussionen und ihre Unterstützung.

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

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

### IX. Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 01.03.2004