

**B4: Ein neues Antigen von *Toxoplasma gondii* mit
„coiled-coil“-Struktur:
Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Aziz Ailyati
aus
Marrakech**

Düsseldorf 2005

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

Referent: Prof. Dr. W. Däubener

Korreferent: Prof. Dr. J. F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.05

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von November 2002 bis April 2005.

Bisherige Veröffentlichungen

Adam R, Russing D, Adams O, Ailyati A, Sik Kim K, Schroten H, Daubener W.

Role of human brain microvascular endothelial cells during central nervous system infection. Significance of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immunoregulation. *Thromb Haemost.* 2005; 94:341-6.

Ailyati A, Nockemann S, Adjogble K.D.Z, Reichmann G, MacKenzie C, Däubener W.

Characterization of a novel coiled-coil antigen of *Toxoplasma gondii*: Involvement of B4 in parasite cell division. 5^{ème} Conference Louis Pasteur sur les maladies Infectieuses, 17-20 November 2004. Paris. (Poster).

Adjogble K.D.Z, Mercier C, Dubremetz J-F, Reichmann G, Ailyati A, MacKenzie C, Cesbron-Delauw M-F, Däubener W.

GRA9, a novel dense granule protein of *Toxoplasma gondii*, is associated with the network of tubular membranes. 5^{ème} Conference Louis Pasteur sur les maladies Infectieuses, 17-20 November 2004. Paris. (Poster).

Ailyati A, Nockemann S, Adjogble K.D.Z, Reichmann G, MacKenzie C, Däubener W.

Characterization of a novel coiled-coil antigen of *Toxoplasma gondii*: Involvement of B4 in parasite cell division. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 24-25 Juni 2005. Düsseldorf. (Poster).

I. Einleitung	1
I.1 Toxoplasma <i>gondii</i> -Erreger der Toxoplasmose.....	1
I.1.1 Der Vermehrungszyklus von <i>T. gondii</i>	1
I.1.2 Toxoplasmose.....	3
I.1.3 Diagnose der Toxoplasmose.....	5
I.1.4 Therapie der Toxoplasmose.....	5
I.1.5 Die Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i>	7
I.2 Struktur von Tachyzoiten und Bradyzoiten.....	8
I.3 Die Invasion der Wirtszellen.....	10
I.4 Endodyogenie: die asexuelle Vermehrung bei <i>T. gondii</i>	14
I.5 Zytoskelett und Fortbewegung von <i>T. gondii</i>	15
I.6 Genetik von <i>T. gondii</i>	19
I.7 Genetische Manipulation von <i>T. gondii</i>	21
I.8 Zielsetzung der Arbeit.....	22
II. Material und Methoden	24
II.1 Material.....	24
II.1.1 Chemikalien.....	24
II.1.2 Sonstige Materialien und Geräte.....	26
II.1.3 Oligonukleotide, Plasmide und verwendeten Antikörper.....	26
II.1.3.1 Oligonukleotide.....	26
II.1.3.2 Plasmide.....	27
II.1.3.3 Verwendete Antikörper und Seren.....	28
II.1.4 Restriktionsenzyme.....	28
II.1.5 Sonstige Enzyme.....	28
II.1.6 Größenstandards.....	29
II.1.6.1 Größenstandards für Proteine.....	29
II.1.6.2 Größenstandards für Nukleinsäuren.....	29
II.1.7 Molekularbiologische Kits.....	29

II.1.8 Verwendeten Organismen.....	29
II.1.8.1 Bakterienstämme.....	29
II.1.8.2 <i>Toxoplasma gondii</i> Stämme.....	30
II.1.8.3 Zelllinien.....	30
II.1.8.4 Mausstämme.....	30
II.1.9 Puffer, Medien und Lösungen.....	30
II.2 Methoden.....	32
II.2.1 Mikrobiologischen Methoden.....	32
II.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)....	32
II.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien.....	32
II.2.1.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	32
II.2.2 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	33
II.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit hoher Reinheit	33
II.2.2.2 Isolierung genomischer DNA.....	33
II.2.2.3 Phenol-/Chloroform-Extraktion.....	33
II.2.2.4 Alkoholfällungen von Nukleinsäuren.....	34
II.2.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	34
II.2.2.6 Isolierungen von Gesamt-RNA.....	34
II.2.2.7 Isolierung von mRNA.....	35
II.2.2.8 Konzentrationbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
II.2.3 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren.....	36
II.2.3.1 Native DNA-Agarosegele.....	36
II.2.3.2 Denaturierende RNA-Agarosegele.....	36
II.2.4 Modifikation und Rekombination von DNA.....	37
II.2.4.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	37
II.2.4.2 DNA-Ligation.....	37
II.2.4.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
II.2.4.4 RT-PCR.....	38
II.2.5 Konstruktionen der Expressionsvektoren.....	39
II.2.5.1 Konstruktion des pGEX-B4-His Vektors.....	39
II.2.5.2 Konstruktion der pTub8-B4-GFP, pTub-B4-YFP und pTub-B4-Myc Vektoren.....	39
II.2.5.3 Konstruktion des pB4-EGFP-Vektors zur Expression in humanen Zellen.....	40
II.2.5.4 Zielvektor zur Generierung von B4-„knock-out“ Mutanten..	40
II.2.6 Markierungen von DNA.....	41
II.2.6.1 Herstellung der Sonden (DIG DNA Labeling Kit, Roche, Mannheim).....	41
II.2.6.2 Qualitätskontrollen der Markierung der Sonde (Dot-Blot)...	41
II.2.6.3 DNA-Sequenzierungen.....	42

II.2.7 Nukleinsäure-Übertragung auf Nylonmembranen.....	42
II.2.7.1 Southern-Blot Analyse von DNA.....	42
II.2.7.3 Northern-Blot Analyse von RNA.....	43
II.2.7.4 Hybridisierung und Chemilumineszenzdetektion.....	43
II.2.8 Biochemische Methoden.....	43
II.2.8.1 Expression und Aufreinigung der GST-B4-His Fusionsproteine.....	43
II.2.8.2 Herstellung von <i>T. gondii</i> - Lyasat.....	44
II.2.8.3 Zellfraktionierungen von <i>T. gondii</i>	45
II.2.8.4 Proteinbestimmung.....	45
II.2.8.5 TCA-Präzipitation.....	46
II.2.8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	46
II.2.8.7 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE Gelen mit Coomassie-Blau.....	48
II.2.9 Immunologische Methoden.....	48
II.2.9.1 Immunoblotting-Verfahren (Western-Blot).....	49
II.2.9.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IFA).....	49
II.2.9.3 Direkte Immunfluoreszenzanalyse mit GFP oder YFP.....	50
II.2.9.4 Analyse der Bewegungsfähigkeit von Toxoplasmen: “gliding motility” assay.....	50
II.3 Zellbiologische Arbeitstechniken.....	50
II.3.1 Zellkulturen.....	50
II.3.1.1 Kultivierung von Wirtszellen.....	51
II.3.1.2 Expression der B4-Protein in 86HG39 Tumorzellen.....	52
II.3.2 Toxoplasmen.....	52
II.3.2.1 In vitro Kultur von <i>T. gondii</i>	52
II.3.2.2 Einfrierung von <i>T. gondii</i> Tachyzoiten.....	53
II.3.2.3 Auftauen von <i>T. gondii</i> Tachyzoiten.....	53
II.3.3 DNA-Transfer in <i>T. gondii</i> Tachyzoten.....	53
II.3.3.1 Transiente Transfektion.....	54
II.3.3.2 Stabile Transfektion.....	54
II.3.3.3 Klonierung von <i>T. gondii</i>	55
II.3.4 Toxoplasmen Proliferationstest.....	55
II.3.5 Gewinnung von Hirnzysten.....	56
II.3.6 FACS Analyse.....	56
II.4 Computergestützte Auswertungsprogramme	58

III. Ergebnisse.....	59
III.1 Analyse des B4-Gens.....	60
III.2 Nachweis der Kopienzahl des B4-Gens im Genom durch Southern-Blot-Analyse.....	61
III. 3 Nachweis der B4-mRNA.....	62
III.3.1 Semi-Quantitative RT-PCR.....	63
III.4 Analyse der B4-Aminosäuresequenz.....	64
III.5 Nachweis und Lokalisation des B4-Proteins in <i>T. gondii</i>	68
III.5.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem B4-Protein.....	69
III.5.2 Ist das B4-Protein ein immundominantes Antigen von <i>T. gondii</i> ?.....	70
III.5.3 Charakterisierung der Reaktivität des polyklonalen Antiserums gegen das B4-Protein.....	72
III.5.4 Lokalisation des B4 Proteins in Tachyzoiten von <i>T. gondii</i>	74
III.5.5 Expression des B4-Proteins in <i>T. gondii</i> Bradyzoiten.....	76
III.5.6 Analyse der subzellulären Verteilung des B4-Proteins.....	77
III. 6 Analysen zur Funktionsbestimmung des B4-Proteins.....	79
III. 6.1 Erzeugung von B4-„Knock-out“ Mutanten.....	79
III. 6.2. Expression von rekombinantem B4-Protein in Tachyzoiten von <i>T. gondii</i>	82
III.6.2.1 Transiente Transfektion von <i>T. gondii</i> Tachyzoiten mit pTub8-B4-GFP.....	83
III.6.2.2 Stabile Expression von B4-YFP Fusionsproteinen in RH- Toxoplasmen.....	85
III.6.2.3 Stabile Expression von B4-Myc Fusionsproteinen in RH- Toxoplasmen.....	88
III.7 Funktionelle Analyse von RH-B4-Myc und RH-B4-YFP Mutanten....	90
III.7.1 Charakterisierung der Residualkörper.....	91
III.7.2 Wachstumsbestimmung mit RH-B4-Myc und RH-B4-YFP Mutanten.....	92
III.7.3 Analyse der „gliding motility“.....	96
III.7.4 Die „invasion assay“-Analyse.....	97
IV. Diskussion.....	101
IV.1 Charakterisierung und Lokalisation des B4-Gens von <i>T. gondii</i>	101
IV.2 Das B4-Protein enthält eine „coiled-coil“-Domäne.....	103
IV.3 Die Expression und Lokalisation des B4-Proteins in <i>T. gondii</i>	107

IV.4 Das B4-Protein wird sowohl in Tachyzoiten als auch in Bradyzoiten exprimiert.....	108
IV.5 Das B4-Protein kommt als freies und als membrangebundenes Protein vor.....	109
IV.6 Serologische Untersuchungen.....	111
IV.7 Funktionelle Charakterisierung des B4-Proteins bei <i>T. gondii</i>	112
IV.7.1 B4 „knock-out“-Mutanten von <i>T. gondii</i>	112
IV.7.2 Funktionelle Folgen der Überexpression des B4-Proteins in Toxoplasmen.....	113
IV.7.3 Die Überexpression des B4-Proteins in Toxoplasmen verursacht eine Reduktion des Parasitenwachstums in vitro ...	115
IV.7.4 Die Überexpression des B4-Proteins verursacht eine Störung der „gliding motility“	117
IV.7.5 Analyse der Invasionsfähigkeit von B4 Mutanten.....	118
V. Zusammenfassung	120
VI. Referenz.....	122
VII. Abkürzungsverzeichnis.....	140
VIII. Danksagung.....	143

I. Einleitung

I.1 *Toxoplasma gondii* -Erreger der Toxoplasmose

Toxoplasma gondii (*T. gondii*), der Erreger der Toxoplasmose, ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der alle warmblütigen kernhaltigen Tierzellen infizieren kann (Gross and Bohne, 1994). Er wurde erstmalig 1908 von C. Nicolle und L. Manceaux aus dem nordafrikanischen Wüstennagetier *Ctenodactylus gundi* isoliert. Die Gattung *Toxoplasma* gehört zum Stamm der Apicomplexa, Unterklasse Protozoa (Levine *et al.*, 1980), dem auch die humanpathogenen Parasiten *Plasmodium falciparum* und *Cryptosporidium parvum* sowie die tierpathogenen *Sarcocystis*, *Neospora* und *Theileria* zugeordnet sind. Die Bezeichnung Apicomplexa ist aus dem Apikalkomplex, den alle vegetativen Stadien aufweisen, abgeleitet. Zu diesem Apikalkomplex gehören spezialisierte sekretorische Organellen (Rhoptrien, Mikronemen) und Cytoskelettelemente (Conoid), die für das Eindringen in die Wirtszelle benötigt werden (Dubey *et al.*, 1998).

T. gondii zählt zu den am weitesten verbreiteten Krankheitserregern. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert ist. In Mitteleuropa sind bis zu 70% der Einwohner *Toxoplasma*-positiv (Hermentin and Aspöck, 1987) und in den USA zählt *Toxoplasma* neben *Salmonella* und *Listeria* zu den drei wichtigsten Verursachern nahrungsmittelbedingter Infektionskrankheiten (Mead *et al.*, 1999). Die Infektion mit Toxoplasmen erfolgt durch den Verzehr von zystenhaltigem Fleisch, durch die Aufnahme von Lebensmitteln, die mit sporulierten Oozysten kontaminiert sind oder durch Kontakt mit Katzenkot der sporulierte Oozysten enthält (Aramini *et al.*, 1999).

I.1.1 Der Vermehrungszyklus von *T. gondii*

Der Vermehrungszyklus von *T. gondii* ist durch drei Generationswechsel (Oozysten, Tachyzoite und Bradyzoiten) mit einem Wechsel zwischen sexueller und asexueller Fortpflanzung gekennzeichnet (Abbildung 1).

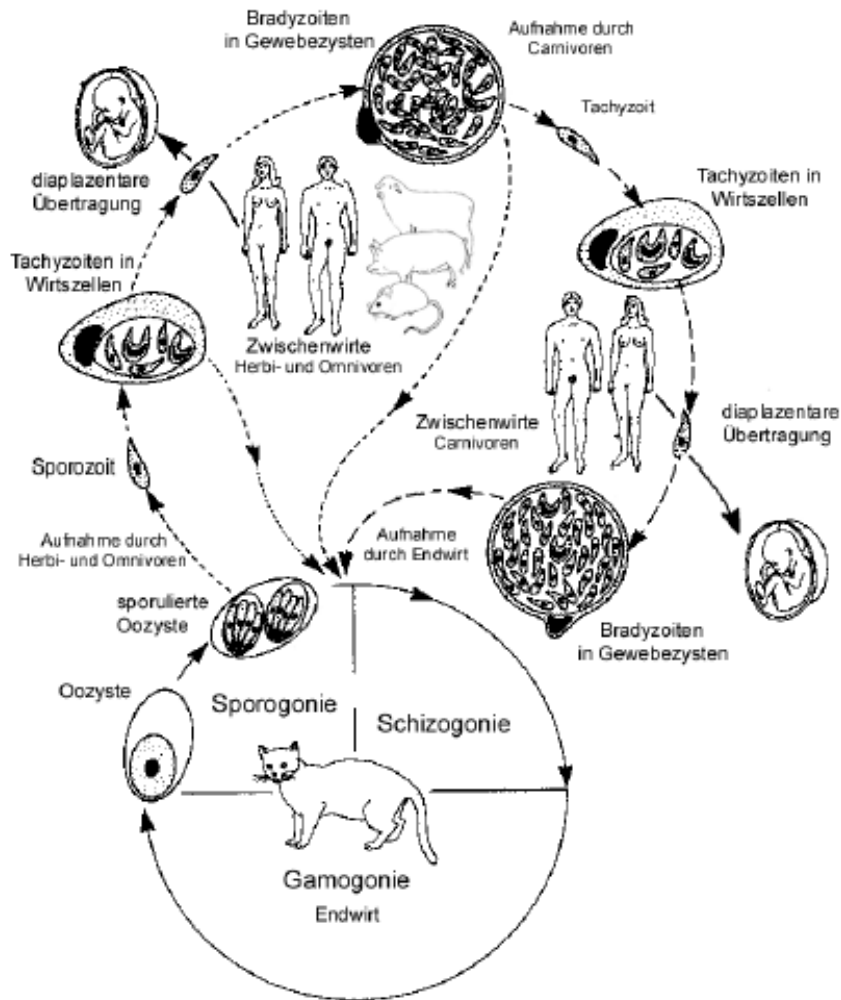


Abbildung 1: Lebenszyklus von *T. gondii*

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

Nach oraler Aufnahme von Gewebezysten durch ein katzenartiges Tier (Felidae), dringt der haploide Parasit in dessen Darmzellen ein und durchläuft mehrere asexuelle Teilungsschritte bevor er sich in Mikro- oder Makrogametozyten differenziert. Nach Gamogonie der beiden Gameten wird eine Oozyste gebildet, die über den Kot ausgeschieden wird (Freyre *et al.*, 1989). Die Oozysten, als einziges diploides Stadium von *T. gondii*, enthalten zwei Sporozysten mit je

vier Sporozoiten (Sporogonie) (Frenkel *et al.*, 1970). Erst nach Abschluss der Sporulation sind die Oozysten infektiös. Ihre Infektiosität bleibt aufgrund der außerordentlichen Widerstandsfähigkeit in feuchter Umgebung über Monate bis Jahre erhalten.

Im Zwischenwirt (Wirbeltiere und Vögel), differenzieren sich die Sporozoiten zu sich schnell teilenden Tachyzoiten (griech. tachys = schnell), welche die akute Phase der Infektion auslösen. Die Tachyzoiten können Zellen verschiedener Gewebe infizieren und auch eine vertikale Transmission auf den sich entwickelnden Föten ist möglich. Die Tachyzoiten teilen sich asexuell durch Endodyogenie, bei der zwei Tochterzellen innerhalb einer Mutterzelle entstehen. Dieser Vorgang läuft in der parasitophoren Vakuole so lange ab, bis die Wirtszelle komplett ausgefüllt ist und aufplatzt, so dass die Tachyzoiten frei werden. Nach dem Einsetzen der Immunantwort des Wirtes gegen die freien Tachyzoiten beginnt ihre Differenzierung zu den Bradyzoiten (griech. bradys = langsam), wobei die parasitophore Vakuole zu einer Zystenhülle ausgebaut wird (Ferguson and Hutchison, 1987; Dubey *et al* 1998). Es bilden sich in den Zellen Gewebezysten, die vor allem in der Muskulatur, aber auch im Gehirn oder in der Netzhaut des Auges latent überdauern. Die Bradyzoiten vermehren sich ebenfalls durch Endodyogenie und weisen eine stark reduzierte Replikationsrate auf. Im Bradyzoitenstadium kann der Parasit lebenslang in Gewebezysten persistieren ohne den Wirt zu schädigen. Sobald jedoch zystenhaltiges Gewebe von einem potentiellen Zwischenwirt aufgenommen wird, beginnt ein neuer Infektionszyklus mit der Umwandlung der Bradyzoiten in Tachyzoiten (Pettersen, 1979). Wird ein mit Zysten infizierter Zwischenwirt von einer Katze, dem Endwirt des Parasiten, gefressen, löst sich die Zystenhülle im Magen auf und die Bradyzoiten infizieren die Dünndarm-Epithelzellen. Dort initiieren die Bradyzoiten mehrere Generationen sexueller Vermehrung, wobei sie zu männlichen und weiblichen Gametozyten differenzieren, die einen neuen Lebenszyklus beginnen.

I.1.2 Toxoplasmose

Der Infektionsweg zum Menschen erfolgt meist über Toxoplasma-Zysten und sporulierte Oozysten. Die Toxoplasma-Zysten können in rohen oder ungenügend erhitztem Fleisch enthalten sein und so auf oralem Wege vom Menschen aufgenommen werden. In Deutschland und anderen Industrienationen gilt zystenhaltiges Fleisch besonders von Schwein, Lamm oder Ziege, selten vom Rind, als häufigste Infektionsquelle für den Menschen.

Der Infektion mit *T. gondii* folgt eine in der Regel harmlos verlaufende Erkrankung. Nur in seltenen Fällen treten unspezifische Symptome wie Kopfschmerz, Fieber oder Schwellung der Lymphknoten auf. Seltener entwickelt sich, insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, eine Meningoenzephalomyelitis. Die Infektion ist am Vorhandensein spezifischer Antikörper im Serum erkennbar. Durch Einsetzen der Immunabwehr wird die Tachyzoitenvermehrung gehemmt. Dabei wird der Parasit jedoch nicht vollständig eliminiert, sondern es bilden sich intrazelluläre Zysten aus. Man findet diese in zahlreichen Geweben, bevorzugt in den Neuronen des Zentralnervensystems (ZNS), im Auge, in der Muskulatur und im Uterus, andere Organe werden seltener befallen. Dieser Verlauf entspricht der postnatalen Toxoplasmose bei einem immunkompetenten Wirt.

Im Unterschied zur oben beschriebenen postnatalen Toxoplasmose, verläuft die pränatale Infektion ungünstiger. Infiziert sich eine Frau erstmals in der Schwangerschaft, breiten sich die Parasiten über Blut und Lymphe im gesamten Organismus aus und der Erreger kann durch die Plazenta den Fötus, dessen Immunsystem noch unreif ist, infizieren und schädigen. Je nachdem, in welchem Entwicklungsstadium des Fötus sich die Mutter infiziert, kann die Infektion beim Ungeborenen zu erheblichen Entwicklungsstörungen führen. Während die Übertragungswahrscheinlichkeit mit fortschreitender Schwangerschaftsdauer zunimmt, nehmen die Wahrscheinlichkeit und der Schweregrad der klinischen Manifestation ab (Djurkovic-Djakovic, 1995; Wong and Remington, 1992). Das Spektrum klinischer Symptome ist groß und reicht von Hydrocephalus („Wasserkopf“), chronischen Entzündungen des Augenhintergrundes (Chorioretinitis), geistiger Retardierung bis hin zum Abort.

Die Toxoplasmose stellt auch für Menschen mit einer Abwehrschwäche eine Gefahr dar. Dies betrifft insbesondere HIV-positive Patienten oder auch Transplantationspatienten, bei denen, zur Vermeidung von Transplantatabstoßungen, eine massiv immunsuppressive Therapie durchgeführt werden muss. Dabei kann bei diesen immunsupprimierten Patienten ein Übergang der Bradyzoiten, die gelegentlich aus den Zysten ausbrechen, in das Tachyzoitenstadium stattfinden (Kayser *et al.* 1993). Typische Symptome für diese Toxoplasmen-Enzephalitis sind Desorientierung, Krampfanfälle, Sprachstörungen und Bewegungsstörungen. Unbehandelt kann die Toxoplasmose bei AIDS-Patienten innerhalb weniger Wochen zum Tod führen (Luft and Remington 1992).

I.1.3 Diagnose der Toxoplasmose

Bei der Toxoplasmose Diagnostik hat sich vor allem der Nachweis parasitenspezifischer IgM- und IgG-Antikörper als sinnvoll erwiesen, denn schon eine Woche nach der Infektion ist ein Anstieg von IgM-Antikörpern nachweisbar. IgG-Antikörper werden erst später nachgewiesen und erreichen nach etwa vier Monaten die höchste Konzentration. Das alleinige Vorhandensein spezifischer IgG-Antikörper ist ein Zeichen für eine latente bzw. chronische Toxoplasmeninfektion. Eine akute Infektion zeichnet sich dagegen durch einen ansteigenden Titer von IgG-Antikörper zusätzlich zum Vorhandensein von IgM-Antikörper aus (Kayser *et al.*, 1993). Auch spezifische IgA- und IgE-Antikörper werden in letzter Zeit zur Diagnostik herangezogen. Diese beiden Antikörper sind ebenso wie die IgM-Antikörper Indikatoren für eine kürzlich erworbene Infektion (Takahashi *et al.*, 1994; Pinon *et al.*, 1990). Bereits nach etwa ein bis zwei Wochen kann mit serologischen Methoden eine Primärinfektion diagnostiziert werden (Gross, *et al.*, 1995). Bei den Toxoplasma-IgG-Bestimmungen gilt der Sabin-Feldman-Test als Goldstandard zur Beurteilung von Sensitivität und Spezifität. Für die anderen Immunglobulinklassen gibt es leider keinen solchen „Goldenen Standard“ (Patel *et al.*, 1993). Zum Nachweis von IgM-Antikörpern wurden der Immunosorbent-agglutination assay (ISAGA) oder der IgM-Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (IgM-ELISA) zur Routinediagnostik verwendet (Desmonts *et al.*, 1981). Bei nicht eindeutig interpretierbaren serologischen Befunden wird die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zum Nachweis von Toxoplasma-DNA in Blut, Liquor, Fruchtwasser oder Gewebeproben eingesetzt (Gross *et al.*, 1992). Die PCR eignet sich besonders bei AIDS-Patienten zur Diagnostik, da unter Umständen trotz einer Infektion keine signifikanten Antikörper nachgewiesen werden können und damit eine rechtzeitige Therapie versäumt wird.

I.1.4 Therapie der Toxoplasmose

Da die Infektion im allgemeinen wenige Beschwerden verursacht, ist eine Therapie meist nicht erforderlich. Schwangere Frauen mit einer Neuinfektion müssen allerdings behandelt werden, auch wenn keinerlei Beschwerden bestehen, um einer Infektion des Kindes vorzubeugen. Das Hauptziel der Therapie besteht darin, die Vermehrung der Parasiten während der akuten Infektionsphase zu unterbinden. Am weitesten verbreitet ist die Behandlung mit der Kombination von Pyrimethamin und Sulfadiazin oder die Monotherapie mit Spiramycin. Während der

Schwangerschaft werden die ersten beiden Präparate bevorzugt eingesetzt, im ersten Trimenon ist jedoch lediglich eine Spiramycintherapie möglich. Während Pyrimethamin die Dehydrofolatreduktase hemmt, blockiert Sulfadiazin die Dehydrofolatsynthase (Ruf and Pohle, 1995). Da sich die Sulfonamid/Pyrimethamin Therapie auf den Folsäurestoffwechsel und damit auf die Blutbildung auswirkt, wird als Vorsorge gegen diese Nebenwirkung noch Folsäure zugegeben. Die Folsäure beeinflusst nicht die antiparasitäre Wirkung der Standardtherapie, da sie von den Toxoplasmen, im Gegensatz zu menschlichen Zellen, nicht aufgenommen werden kann (Ruf and Pohle, 1995). Spiramycin hingegen verhindert durch eine Hemmung der Proteinsynthese die Transmission des Erregers auf den Fötus, wodurch es bei negativem Erregernachweis mittels PCR bis zur Geburt des Kindes auch als Monotherapie verwendet werden kann (Gratzl *et al.*, 1998). Die Spiramycintherapie ist jedoch bei schon erfolgter fetaler Infektion nicht ausreichend, da Spiramycin nur in geringem Ausmaß plazentagängig ist (Couvreux *et al.*, 1988). In diesem Fall ist eine Kombinationstherapie ab dem zweiten Trimenon bis zur Geburt notwendig. Bei immunsupprimierten Patienten mit positiver Serologie und weniger als 200 T-Helferzellen pro Mikroliter Blut ist eine prophylaktische Gabe von Antibiotika sinnvoll, um eine Reaktivierung zu vermeiden. In den letzten Jahren wurden neue Substanzen gefunden, die sich allein oder in Kombination als gegen Toxoplasmen wirksam erwiesen haben, wie Atovaquon, Azithromycin und Clarithromycin. Eine vollständige Eliminierung der Toxoplasmen ist trotz verschiedenster chemotherapeutischer Ansätze bisher nicht möglich, da diese Antibiotika nur gegen die Tachyzoiten und nicht gegen die Bradyzoiten wirken (Dubey, 1998). Die chronische Infektion kann durch die medikamentöse Therapie nicht verhindert werden.

Bisher gibt es für den Menschen noch keinen Impfstoff gegen die Toxoplasmose. Zurzeit wird die Immunisierung von Schafen mit lebenden, attenuierten *T. gondii* Tachyzoiten des Stammes S48 kommerziell in Europa und Neuseeland erfolgreich durchgeführt (Buxton *et al.*, 1991). Der Einsatz solcher avirulenter *T. gondii* Mutanten für die Immunisierung beim Menschen ist nicht sinnvoll. Das Risiko der Entstehung von Revertanten kann nicht ausgeschlossen werden, ferner ist unklar, ob der Impfstamm selbst eine konnatale Toxoplasmose verursachen kann. Durch DNA-Vakzinierung gegen verschiedene sekretorische Antigene (GRA1, GRA7 und ROP2) konnte in Mäusen eine Typ1-Immunantwort induziert werden, die 70%, 50% bzw. 90% der Tiere vor einer letalen Infektion schützte (Vercammen *et al.*, 2000).

I.1.5 Die Immunabwehr gegen *T. gondii*

Für die Kontrolle des obligat intrazellulären *T. gondii* Parasiten spielt sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort eine tragende Rolle (Lieberman and Hunter, 2002). Aufgrund ihrer intrazellulären Lebensweise sind die Parasiten der humoralen Abwehr nur eingeschränkt zugänglich. In der Mukosa des Darms können Antikörper-vermittelte Abwehrmechanismen die Verbreitung des Parasiten verlangsamen (Chardes and Bout, 1993). Die effektive Kontrolle der Infektion erfolgt in erster Linie durch die zellvermittelte Abwehr. Viele verschiedene phagozytierende Zelltypen, besonders dendritische Zellen und Makrophagen sind an dieser zellulären Immunantwort beteiligt. Diese Mechanismen begrenzen einerseits die Ausbreitung der Parasiten und leiten andererseits die Induktion einer spezifischen Immunantwort ein. Die dendritischen Zellen werden sowohl durch Infektion mit Toxoplasmen als auch durch Kontakt mit löslichen Toxoplasma-Extrakten zur Sekretion des Zytokins Interleukin-12 (IL-12) stimuliert (Reis e Sousa *et al.*, 1997). Wahrscheinlich stellen die *Toxoplasmen* mehrere Faktoren her, die die dendritischen Zellen zur IL-12-Produktion anregen. Einer dieser Faktoren ist das *T. gondii* Cyclophilin-A Protein. Dieses bindet an den Chemokinrezeptor CCR5 auf der Oberfläche der dendritischen Zellen, und induziert durch ein Signalkaskade die Produktion der IL-12-Moleküle (Aliberti *et al.*, 2003). Auch Makrophagen sezernieren nach Interaktion mit Toxoplasmen oder deren Proteinen IL-12. Die Infektion von IL-12 „Knock-out“ (IL-12^{-/-}) Mäusen bzw. die systemische Depletion von IL-12 in infizierten Wildtyp-Mäusen führte zu einer 100%tigen Mortalität nach einer *T. gondii* Infektion der Tiere, während die unbehandelten Wildtyp Tiere die Infektion überlebten (Gazzinelli *et al.*, 1994; Yap *et al.*, 2000).

Die wesentliche Funktion von IL-12 ist die Induktion der Interferon-gamma (INF- γ) Produktion durch natürliche Killer (NK)-Zellen und durch Toxoplasma-spezifische CD4- und CD8-T-Lymphozyten. Während NK-Zellen nur in der sehr frühen Phase der Infektion wichtige INF- γ -Produzenten sind, stellen *T. gondii*-spezifische CD4- und CD8- T-Lymphozyten INF- γ sowohl in der akuten als auch chronischen Phase der Infektion her (Gazzinelli *et al.*, 1992). Neben der indirekten Wirkung über die Produktion von Zytokinen sind T-Zellen auch direkt an der Toxoplasmen-Abwehr beteiligt. Extrazelluläre Toxoplasmen können durch aktivierte CD4 und CD8 T-Zellen abgetötet werden (Khan *et al.*, 1990).

Die Neutralisation von INF- γ durch Behandlung der infizierten Tieren mit anti-INF γ Antikörpern resultiert in einer massiven Enzephalitis und der Entwicklung großer nekrotischer Herde im Hirn

(Suzuki *et al.*, 1989). Eine zentrale Funktion von IFN- γ ist es, die Induktion antimikrobieller Effektormechanismen in infizierten Wirtszellen zu bewirken. Da die meisten Zellen einen Rezeptor für IFN- γ besitzen, wirkt dieses Zytokin praktisch auf alle Körperzellen. Es sind bis heute, je nach Zelltyp, mindestens fünf verschiedene antiparasitäre Effektormechanismen bekannt, die die Proliferation von *T. gondii* in einer Vielzahl von Effektorzellen verhindern. Dabei handelt es sich bei Makrophagen und Mikrogliazellen der Maus, um die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthase. Durch NO wird die Proliferation von *T. gondii* gehemmt (Adams *et al.*, 1990). Bei Astrozyten der Maus üben dagegen die induzierbaren GTP-bindenden Proteine (iGTP) den stärksten antiparasitären Effekt aus. iGTP^{-/-} Mäusen sterben während der akuten Phase der *T. gondii* Infektion und sind trotzdem resistent gegen andere mikrobielle Infektion (Taylor *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2004). Die Reduktion der intrazellulären Eisenkonzentration in Darmzellen der Ratte führt ebenfalls zur Toxoplasmostase (Dimier and Bout, 1998). Im Gegensatz zu Zellen der Maus wird bei einigen humanen Zellen wie Endothelzellen und Astrozyten ein weiterer Effektormechanismus aktiviert. Nach IFN- γ -Stimulation exprimieren die infizierten Zellen die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO). Die IDO entzieht in infizierten Zellen den Toxoplasmen die für sie lebenswichtige Aminosäure Tryptophan (Däubener *et al.*, 2001). Als fünften Mechanismus wurde in phagozytischen Zellen die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (H₂O₂, O₂⁻, ¹O₂ und OH⁻) identifiziert. Es ist aber bekannt, dass sich *T. gondii* durch die Produktion von „scavenger“-Molekülen wie z.B. der Superoxiddismutase, der Katalase sowie der Gluthation-Peroxidase zumindest teilweise diesem Effektormechanismus entziehen kann (Kwok *et al.*, 2004).

Bei einigen Zelltypen, wie den Neuronen, den vielleicht wichtigsten Zellen für persistierende Toxoplasma-Zysten, ist bisher noch völlig unklar, wie der Parasit kontrolliert wird. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Effektormechanismen existieren, die bei der Abwehr der Parasiten in diesen Zellen beteiligt sind.

1.2 Struktur von Tachyzoiten und Bradyzoiten

Extrazelluläre Tachyzoiten und Bradyzoiten sind in ihrer Morphologie lichtmikroskopisch kaum zu unterscheiden. Die Parasiten sind etwa 4 bis 6 μ m lang und 2 bis 4 μ m breit und besitzen eine leicht gebogene Form, wobei Bradyzoiten etwas schlanker sind (Weiss and Kim, 2000). Der Zellkern befindet sich bei Tachyzoiten in der Mitte der Zelle, während er in Bradyzoiten am

posterioren Pol lokalisiert ist. Der Parasit ist von einer Pellicula, die aus drei Membranen besteht, nämlich der Plasmamembran und zwei inneren Membrankomplexen IMC1 und IMC2 umgeben. Die Pellicula verläuft von den präkonoidalen Ringen bis zum posterioren Ende der Zelle (Dubremetz and Torpier, 1978). Eine Unterbrechung findet sich im Bereich der Mikropore, bei der es sich vermutlich um eine aktive Endozytose-Region handelt, auch Clathrin-beladene Vesikel scheinen in diesem Bereich vorhanden zu sein (Nichols *et al.*, 1994). Am vorderen Pol befindet sich der Apikalkomplex, der aus dem Conoid und zwei sekretorischen Organellen, den Mikronemen und den Rhoptrien, besteht. Die Struktur der Rhoptrien von Tachyzoiten ist keulenförmig, während sie bei Bradyzoiten eine Schleife ausbilden. Weitere elektronenmikroskopisch nachweisbare Zellorganellen von *T. gondii* sind das endoplasmatische Reticulum, die Mitochondrien und der Golgi Apparat. Das Trans-Golgi Netzwerk scheint als Sortierort für Proteine zu fungieren, die entweder sezerniert werden oder zum endoplasmatischen Reticulum zurücktransportiert werden müssen (Ngo *et al.*, 2000). Die „dense granula“, eine weitere Art von sekretorischen Organellen, sind im ganzen Cytoplasma der Tachyzoiten oder Bradyzoiten verteilt (Carruthers, 1999).

Einen Hauptunterschied zwischen den beiden Stadien stellt das reichliche Vorhandensein von Amylopektin-Granula in Bradyzoiten dar. Bei Tachyzoiten hingegen sind nur wenige Amylopektin-Granula zu finden (Dubey *et al.*, 1998; Guerardel *et al.*, 2005). Die Amylopectin-Granula spielen vermutlich eine Rolle bei der Energieversorgung der Bradyzoiten (Weiss and Kim, 2000).

Zysten haben eine wichtige Bedeutung bei der Übertragung der Toxoplasmose, da sie im Gewebe vorkommen und daher Bestandteil der Nahrung fleischfressender Tiere und des Menschen sein können. Die Zysten sind Dauerformen und erreichen einen Durchmesser von 50 bis 70 µm. Innerhalb der Zyste befinden sich bis zu 2000 Bradyzoiten, die im Gegensatz zu Tachyzoiten eine Resistenz gegen Magensäure aufweisen (Jacobs *et al.*, 1960). Bradyzoiten sind in der Lage, Zellen direkt zu infizieren und müssen sich nicht zuerst zu Tachyzoiten umwandeln.

Ein weiteres wichtiges Unterscheidungskriterium von Tachyzoiten und Bradyzoiten sind antigenetische Unterschiede der beiden Stadien, die mit Antikörpern nachgewiesen wurden (Kasper, 1989). Die Proteine SAG1 und SAG2 sind tachyzoitenspezifisch und finden sich auf der Oberfläche der Parasiten (Burg *et al.*, 1988; Mineo *et al.*, 1993). Während der Differenzierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten scheint die Oberfläche des Tachyzoiten eine drastische

Modifizierung zu durchlaufen. Die Hauptoberflächen-Proteine SAG1 und SAG2 verschwinden und neue, wie SAG4 und BSR4, werden exprimiert (Bohne *et al.*, 1999; Lekutis *et al.*, 2000). Weitere Bradyzoiten-spezifische Proteine sind z.B. das cytoplasmatische Protein BAG1 (Bohne *et al.*, 1995; Parmley *et al.*, 1995), das Matrix-Antigen MAG1 und das Zystenwandprotein CST1 (Parmley *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1992).

Die Differenzierung von Tachyzoiten zu Bradyzoiten konnte *in vitro* durch den Einfluß verschiedene Stress Faktoren wie z.B. Kultivierung bei erhöhter Temperatur, Anhebung des pH-Werts im Medium oder durch Zugabe von Chemikalien wie Natriumarsenit und Pyrimethamin, induziert werden (Soete and Dubremetz, 1996; Gross *et al.*, 1996). Durch eine Aktivierung von Maus Makrophagen mit IFN- γ kann auch die Expression Bradyzoiten-spezifischer Proteine induziert werden (Bohne *et al.*, 1993). In Fibroblasten führt IFN- γ zu einer Reduzierung des Parasitenwachstums, allerdings nicht zu einer Induktion der Stadienkonversion (Pfefferkorn and Guyre, 1984; Gross and Bohne, 1994).

1.3 Die Invasion der Wirtszellen

T. gondii kann sich in allen kernhaltigen Vertebratenzellen aber nicht in den kernlosen Erythrozyten vermehren. Der Invasionsprozess läuft innerhalb von 10-30 Sekunden so schnell und unauffällig ab, dass die Wirtszelle gar nicht über die Infektion alarmiert wird. Die Invasion ist ein aktiver Prozess, der von Aktinfilamenten des Parasiten, nicht aber von denen der Wirtszelle abhängig ist (Dobrowoski and Sibley, 1996). Zuerst muss der Parasit mit seinem apikalen Ende an der Oberfläche der Wirtszelle andocken. Die spezifischen Rezeptoren und Liganden, die an diesem komplexen Vorgang beteiligt sind, wurden noch nicht komplett identifiziert. Es wurde aber gezeigt, dass das parasitäre Laminin-Protein an die $\alpha\beta 1$ -Untereinheiten des Integrin-Moleküles der Wirtszelle bindet (Bonhomme *et al.*, 1999). Weiterhin ist beschrieben, dass das Oberflächenmolekül SAG 1 an Glykolproteine der Wirtszellen binden kann (Mineo *et al.*, 1993; Fourmaux *et al.*, 1996; Ortega and Boothroyd, 1999). Nach der Anheftung an die Wirtszelle reorientiert sich der Parasit, so dass der Apikalkomplex der Wirtszellmembran gegenübersteht. Bei diesem Prozess scheinen weitere parasitäre Proteine wie MIC2 und SAG2 eine wichtige Rolle zu spielen (Lourenco *et al.*, 2001). Eine Maskierung von SAG2 mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern immobilisiert den Parasiten auf der Oberfläche der Wirtszelle, so dass keine Reorientierung mehr stattfinden kann (Smith, 1995; Grimwood and

Smith, 1996). Ferner sind in der Orientierungsphase Mikronemenproteine von Bedeutung, da sie verschiedene adhäsive Domänen wie „epidermal growth faktor“ (EGF), Thrombospondin, Integrin und Lectine enthalten und möglicherweise die Adhäsion des Parasiten an die Wirtszelle vermitteln (Soldati *et al.*, 2001).

Nach der Orientierungsphase wird eine feste Verbindung zwischen der Parasitenplasmamembran und der Wirtszellmembran durch Bildung einer „tight junction“ hergestellt (Michel *et al.*, 1980). Entlang dieser Verbindung dringt der Parasit in die Wirtszellen ein, wobei er wahrscheinlich durch einen Aktin-Myosinmotor angetrieben wird (Soldati *et al.*, 2001). Bei dem Vordringen in das Cytoplasma nimmt der Parasit Bestandteile der Wirtszellmembran mit ihm in die Tiefe und dabei wird die so genannte „moving junction“ gebildet (Abbildung 2). Dieser Prozess beginnt am apikalen Ende des Parasiten und schreitet kreisförmig um den aktiv invadierenden Parasiten bis zum posterioren Ende fort. Nachdem der Parasit eingedrungen ist, verschließt das Pasmalemma die Zelle wieder, so dass der Parasit nun in der sogenannten parasitophoren Vakuole (PV) eingelagert ist. Noch während der Invasion entleeren die Rhoptrien ihren Inhalt in die entstehende parasitophore Vakuole, wobei für einige Proteine wie ROP1 und ROP2 eine spätere Lokalisierung auf der Membran der parasitophoren Vakuole nachgewiesen werden konnte (Saffer *et al.*, 1992). ROP-Proteinen wird eine generelle strukturelle Funktion beim Aufbau der parasitophoren Vakuole zugeschrieben.

Die PV fusioniert nicht mit Vakuolen der Wirtszelle, da der Parasit sämtliche Wirtszell-Protein aus der parasitophoren Vakuolen Membran (PVM) entfernt und sie durch parasitäre Proteine besonders mit Proteinen aus den Rhoptrien ersetzt (Carruthers and Sibley, 1997; Joiner and Ross, 2002). Eine Ansäuerung der PV wird verhindert und die Fusion mit Lysosomen vermieden (Sibley *et al.*, 1985; Joiner *et al.*, 1990; Hakansson *et al.*, 2001). Die PVM bildet eine Barriere zwischen dem Parasiten und dem Cytosol der Wirtszelle, die allerdings unselektive Poren enthält. Durch diese Poren können Ionen und Moleküle bis zu 1300 Da frei diffundieren (Schwab *et al.*, 1994). So wirken sich die Ionentransportvorgänge des Parasiten innerhalb der Vakuole direkt auf das Membranpotential der Wirtszelle aus. So findet nach Infektion mit *T. gondii* eine Hyperpolarisation der Wirtszellplasmamembran statt (Bouchot *et al.*, 2001). Durch Rezeptoren in der Wand der PVM können Lipide wie Cholesterol aktiv aufgenommen werden (Charron and Sibley, 2002). Außerdem nimmt man an, dass *T. gondii* einen weiteren Weg sich ausreichend mit Nahrung zu versorgen entwickelt hat. Um die PV herum findet eine deutliche Anreicherung von

Wirtszell-ER und Mitochondrien statt. Dies könnte der Energie- und Nährstoffversorgung des Parasiten dienen (Sinai *et al.*, 1997). Dabei spielt ROP2 für diese dichte Anlagerung von Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle an die Außenseite der parasitophoren Vakuole eine wichtige Rolle (Sinai *et al.*, 1997; Sinai and Joiner, 2001).

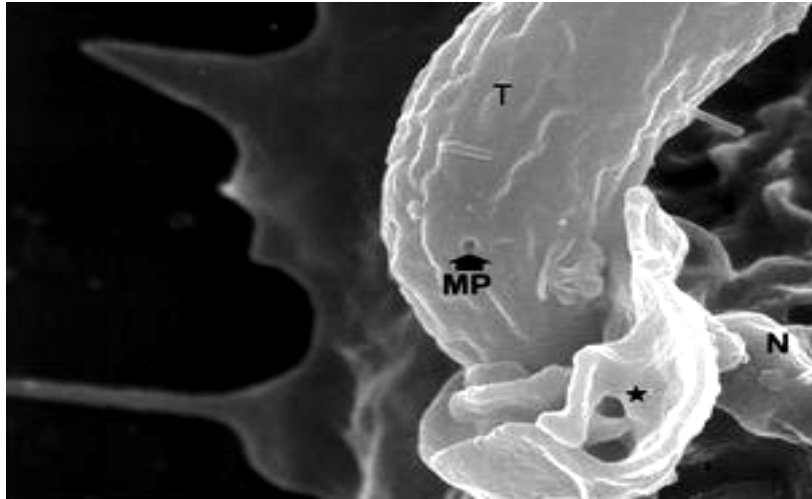


Abbildung 2: Bildung der „moving junction“ bei *T. gondii*

Gezeigt ist die Invasionsstelle, an der die Wirtszell- und Parasiten-Plasmamembran aufeinandertreffen mit der Bildung von „moving junction“. Dabei wird die Wirtszellmembran immer weiter eingestülpt. T: Toxoplasma; MP: Micropore; N: Neutrophiler. Entnommen aus (De Souza W, 2005)

Um die PV zu stabilisieren, bildet sich am posterioren Ende des Parasiten ein tubulovesikuläres Netzwerk (Mercier *et al.*, 2002). Dieses Netz (Abbildung 3) besteht aus Membranen mit einem Durchmesser von 60 bis 90 nm, die sich innerhalb der PV fingerförmig ausstülpfen und eine Verbindung zwischen den Parasiten und der PVM ermöglichen. Dadurch könnte das Netzwerk der Aufnahme und dem Transport von für den Parasiten essentiellen Nährstoffen aus dem extrazellulären Milieu dienen (Mercier *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass durch dieses Netzwerk Nährstoffe wie Nukleotide, Aminosäuren, Cofaktoren und einfache Zucker effizient zu den Parasiten gelangen können (Lauer *et al.*, 1997; Sibley, 2003).

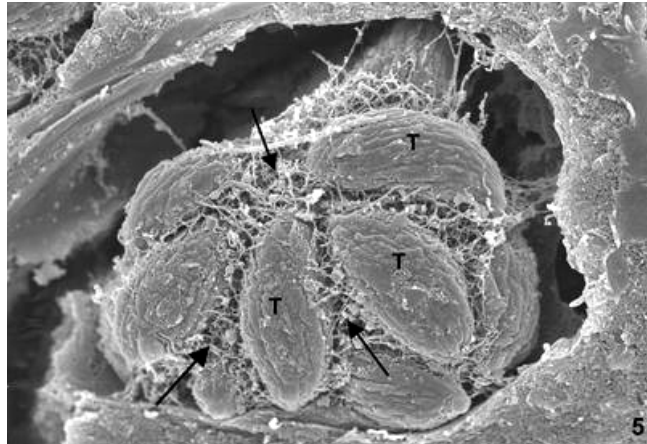


Abbildung 3: Die parasitophore Vakuole mit ihre tubuloveskuläre Netzwerk

T. gondii modifiziert die Vakuole durch die Ausbildung eines tubulomembranösen Netzwerkes (Pfeil), das zur Stabilität des Kompartiments beiträgt, indem es Parasiten und Vakuolenmembran verbindet. T: *T. gondii*. Entnommen aus (De Souza, 2005)

Innerhalb von zehn Minuten nach Invasion in die Wirtszelle fusionieren die „dense granula“ mit der Plasmamembran des Parasiten und entleeren ihren Inhalt in die PV. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess hauptsächlich am apikalen Ende des Parasiten stattfindet und ebenso wie die Sekretion von Mikronemen, Calcium abhängig ist (Dubremetz *et al.*, 1993; Carrunthers and Sibley, 1999; Saffer and Schwartzman, 1991). Im Gegensatz zu Mikronemen und Rhoptrien werden die „dense granula“-Proteine (GRA-Proteine) während der gesamten intrazellulären Entwicklung vom Parasiten kontinuierlich sezerniert. Die GRA-Proteine zählen zu den Excreted-Secreted Antigen (ESAs). ESAs sind hochimmunogen und induzieren sowohl humorale, als auch zelluläre Abwehrmechanismen. Die „dense granula“ Proteine befinden sich nach der Sekretion entweder in löslicher Form im Lumen der PV oder treten in enger Assoziation mit dem Netzwerk, der PVM oder mit beiden Strukturen auf (Carruthers, 1999; Mercier *et al.*, 2005). Bei *T. gondii* wurden bis jetzt zehn GRA-Proteine (GRA1-GRA10) gefunden (Ahn *et al.*, 2005). Die meisten dieser Proteine wurden bereits molekularbiologisch charakterisiert. Eine eindeutige Funktion konnte bisher noch keinem der GRA-Proteine zugeordnet werden. Ausnahme sind hier zwei Isoformen der 5'-Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPasen) die ebenfalls in den „dense granula“ enthalten sind. Diese NTPasen entfernen Phosphatreste von Nucleotiden, wodurch diese besser durch Membranen transportiert werden können (Bermudes *et al.*, 1994). Da die „dense

granula“- Proteine ganz am Ende nach der Invasion ins Spiel kommen, vermutet man, dass sie für die Nährstoffaufnahme von der Wirtszelle bzw. für die Abfallabgabe an die Wirtszelle verantwortlich sind (Cesbron-Delauw, 1994).

Die PV stellt das Kompartiment dar, in dem der Parasit seine intrazelluläre Replikation durchführen kann. Alle 8-12 Stunden vermehren sich die Parasiten asexuell durch Endodyogenie. Nach 6 bis 8 Teilungen befinden sich etwa 64 bis 256 Parasiten in der PV. Die Wirtszelle platzt auf und die freigesetzten Parasiten können neue Zellen infizieren (Radke and White, 1998).

I.4 Endodyogenie: die asexuelle Vermehrung bei *T. gondii*

Innerhalb der PV vermehrt sich *T. gondii* asexuell durch Endodyogenie (Van der Zypern and Piekaski, 1967). Hierbei entstehen durch eine Längsteilung der Mutterzelle zwei Tochterzellen (Abbildung 4). Bei den anderen Parasiten des Stamms Apicomplexa wie *Plasmodium*, *Theileria*, *Eimeria* und *Babesia* kommt es zur Schizogonie anstelle der Endodyogenie (Bannister and Mithcell, 1995; Hepler *et al.*, 1966; Jura *et al.*, 1983; Shaw and Tilney, 1992). Hierbei entstehen aus einer einzigen Mutterzelle mehrere Tochterzellen. Die bei *T. gondii* beobachtete Endodyogenie entspricht quasi dem letzten Zyklus der Kernreplikation und Zellteilung der Schizogonie (Sheffield and Melton, 1968). Die zellulären Signale und die für diesen Prozess nötige Maschinerie sind weitgehend unbekannt. Es wurde aber beobachtet, dass die Kernteilung später in einer ungebrochenen Kernhülle nach der Entstehung von neuen Apicoplasten und Mitochondrien stattfindet. Als Besonderheit ist zu erwähnen, dass bei *T. gondii* der Zellzyklus ohne die Checkpoint Gap G2 Phase abläuft (Radke *et al.*, 2001). Neben der Kernmembran entstehen zwei innere Membranen Komplexe (IMC), welche je die Hälfte der Mutterzellorganellen umschließen. Aus der Plasmamembran der Mutterzelle werden die Plasmamembranen der beiden Tochterzellen generiert. Die Segregation der beiden Tochterzellen beginnt mit der Entstehung einer Teilungsfurche von dem anterioren bis zum posterioren Ende der Mutterzelle. Bei diesem Prozess spielen Elementen des Zytoskeletts eine wichtige Rolle (Goode *et al.*, 2000). Die neu entstandenen Tochterzellen driften auseinander und bleiben nur an ihren posterioren Enden durch Reste der Plasmamembran der Mutterzelle verbunden (Black and Boothroyd, 2000). Diese Verbindung führt bei weiteren Replikationen zur Bildung von Parasiten-Rosetten innerhalb der PV.

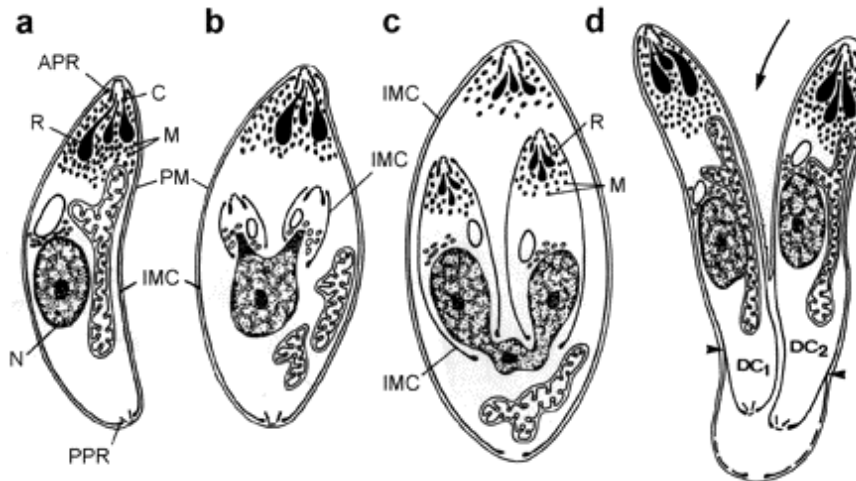


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der Endodyogenie.

(a): Tachyzoit; (b): beginnende Tochterzellbildung; (c): fortschreitende Tochterzellbildung; (d): Ausschlüpfen der Tochterzellen. Entnommen aus (Delbac *et al.*, 2001)

1.5 Zytoskelett und Fortbewegung von *T. gondii*

Das *T. gondii* Zytoskelett besteht aus gerüstartig angeordneten filamentären Strukturen, die an der polarisierten Sekretion, der Fortbewegung und der Segregation der Tochterzellen während der Cytokinese beteiligt sind (Morrissette and Sibley, 2002a). Die Apicomplexa-Parasiten enthalten, wie auch alle anderen eukaryontischen Zellen, eine große Anzahl von Zytoskelettkomponenten wie Mikrotubuli, Aktin und Myosin (Morrissette and Sibley, 2002 b). Bei *Toxoplasma*, *Eimeria* und *Sarcocystis*, nicht aber bei *Plasmodium* und *Theileria* wurde zusätzlich eine weitere zytoskelettale Struktur, das Conoid, gefunden (Abbildung 5). Dieses besitzt eine konische Struktur aus spiralig angeordneten Fibrillen, die mit dem Polarring, einem sogenannten Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC) in Verbindung stehen (Nichols and Chiappino, 1987; Russel and Burns, 1984). Bei extrazellulären Parasiten kann das Conoid rotieren und das aktive Eindringen in die Wirtszelle ermöglichen (Dubey *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2002). Die Behandlung der Parasiten mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin verursacht eine Extension des Conoids. Eine vorherige Behandlung mit Cytochalsin D, einer Actin depolymerisierenden Substanz, kann diese Extension hemmen (Mondragon and Frixione, 1996).

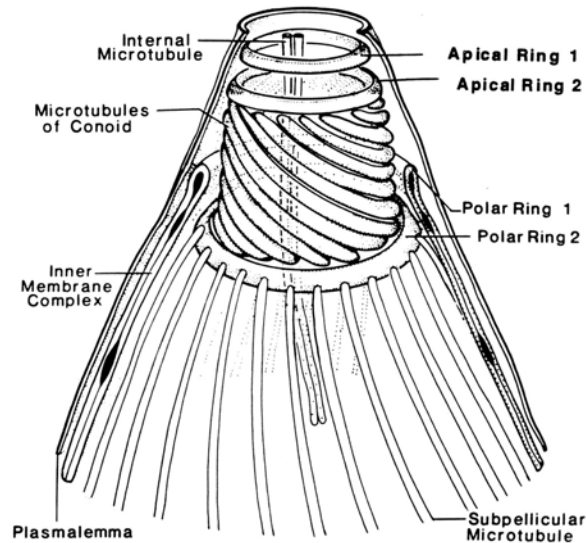


Abbildung 5: Das *T. gondii* Conoid

Das Diagramm stellt den Aufbau des Conoids von *T. gondii* dar. Das Conoid ist eine konische Struktur aus spiralförmig angeordneten Fibrillen. Entnommen aus Dubey *et al.*, 1998.

Tachyzoiten enthalten zwei Typen von Mikrotubuli: die subpelliculären Mikrotubuli und die Spindelmikrotubuli (Morrisette and Sibley, 2002 b). Vom Polarring ausgehend erstrecken sich 22 subpelliculäre Mikrotubuli unter der Pellicula über etwa zwei Drittel der Parasitenkörperlänge. Die subpelliculären Mikrotubuli und die Pellicula sind für die sichelförmige Gestalt und für die apikale Polarität der Apicomplexa-Parasiten verantwortlich (Morrisette *et al.*, 1997; Nichols and Chiappino, 1987). Die Störung der subpelliculären Mikrotubuli verursacht einen Verlust dieser beiden Eigenschaften (Morrisette and Ross, 1998; Stokkermans *et al.*, 1996). Die Pellicula besteht aus der Plasmamembran und zwei inneren Membran Komplexen (IMC), die als typische Merkmale des Unterreiches der Alveolaten gelten, zu denen der Unterstamm der Apicomplexa mit *T. gondii* gehört. Der IMC besteht aus abgeflachten Membranvesikeln, die direkt unter der Plasmamembran des Parasiten liegen (Ogino and Yoneda, 1966). Bei Sporozoiten von Plasmodien besteht der IMC nur aus einem einzelnen großen abgeflachten Vesikel (Dubremetz *et al.*, 1979). Die Funktion dieser Vesikel wurde noch nicht bestimmt, aber ihre enge Assoziation mit Mikrotubuli lässt auf eine Rolle in der Zellmotilität bzw. bei der Strukturgebung schließen.

Die Spindelmikrotubuli sind nur während der Endodyogenie neben den Centriole zu sehen. Sie ermöglichen eine koordinierte Abtrennung der Chromosomen während der Anaphase (Morissette and Sibley, 2002 b). Die Destruktion der Mikrotubuli mit hohen Konzentrationen von Oryzalin verhindert die Vermehrung der Parasiten, nicht aber deren Größenwachstum (Stokkermans *et al.*, 1996).

Immunelektronenmikroskopische Untersuchung an Tachyzoiten haben gezeigt, dass Aktin in großen Menge im Conoid, im präconoidalen Ring und in den subpelliculären Mikrotubuli vorhanden ist (Yasuda *et al.*, 1988). Aktin wird von einem einzigen Gen kodiert und liegt bis zu 98% in löslicher monomerer Form vor (Dobrowolski *et al.*, 1997). Nur nach der Behandlung der Parasiten mit Jasplakinolid, einer Aktin polymerisierenden Substanz, ist es möglich die Aktin-Filamente bei *T. gondii* elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen (Poupel and Tardieux, 1999; Shaw and Tilney, 1999). Die Fähigkeit von G-Aktin zur Polymerisation in F-Aktin und zur Depolymerisation unter Rückbildung von G-Aktin zählt zu den wichtigsten Eigenschaften von Aktin, die für die Invasion der Toxoplasmen notwendig ist (Dobrowolski and Sibley, 1996). Bis jetzt sind nur zwei Proteine, die für die Regulation der Aktin-Polymerisation verantwortlich sind, gefunden worden, nämlich Aktin-Depolymerisation-Faktor (ADF) (Allen *et al.*, 1997) und Toxofilin (Poupel *et al.*, 2000). Neue Studien haben gezeigt, dass die Aktin-Dynamik durch die Phosphorylierung von Toxofilin mittels Casein Kinase II gesteuert wird (Delorme *et al.*, 2003).

Das Motorprotein Myosin, das mit Aktin während der Fortbewegung in Verbindung kommt, ist wie Aktin an der anterioren Seite des Parasiten konzentriert aber auch entlang des inneren Membran-Komplexes nachweisbar (Dobrowolski *et al.*, 1997; Schwartzman and Pfefferkorn, 1983). Bis jetzt wurden bei Toxoplasmen 5 verschiedenen unkonventionellen Typen von Myosin gefunden, die alle phylogenetisch zur Myosin Klasse XIV gehören: TgM-A, TgM-B, TgM-C, TgM-D und TgM-E.

Myosin B und C sind durch alternatives Splicing der mRNA eines einzigen Genes entstanden. Die beiden Myosine können durch ihr IQ-Motiv (Consensus IQXXRGXXRK) Calmodulin binden und sind am apikalen Bereich neben dem Golgiapparat zu finden. Myosin-A dagegen enthält kein IQ-Motiv und ist entlang der Plasmamembran in enger Beziehung mit IMC lokalisiert. Myosin-D und Myosin-E sind ähnlich zu Myosin-A, wurden aber nur bei Bradyzoiten gefunden (Optiz and Soldati, 2002).

T. gondii besitzt genauso wie die übrigen Parasiten des Stammes Apicomplexa keine Cilien oder Flagellen, sondern bewegt sich gleitend auf festen Oberflächen vorwärts. Dieser Fortbewegungsprozess wird als „gliding motility“ bezeichnet (Sibley *et al.*, 1998) und wird durch den parasitären Aktin-Myosin-Motor vorangetrieben (Dobrowolski *et al.*, 1997). Die Fortbewegung ist energieabhängig und verursacht keine größeren Konformationsänderungen des Parasiten (Ménard, 2001). Essentiell für diese Art der Bewegung ist die Bindung an eine feste Oberfläche, insbesondere an die Oberfläche der Wirtszelle. Dafür spielen die Mikronemenproteine der Thrombospondin-Familie (TRAP Familie) wie z.B. MIC2 eine wichtige Rolle (Abbildung 6). Das Modell der „gliding motility“ besagt, dass die Mikronemen-Proteine an einem Pol auf der Zelloberfläche der Parasiten exprimiert werden und gerichtet vom apikalen zum posterioren Ende transloziert werden, bevor sie dann von der Oberfläche des Parasiten abgespalten werden (Sibley, 2004). Der Prozess ist energieabhängig und erlaubt eine Bewegung des Parasiten um bis zu 10µm pro Sekunde (King, 1988). Mit Hilfe des Aktin-Myosin-Motors können die Toxoplasmen zirkuläre, drehende und helikale Bewegungen durchführen, wobei nur letztere zur Invasion in die Wirtszelle führen.

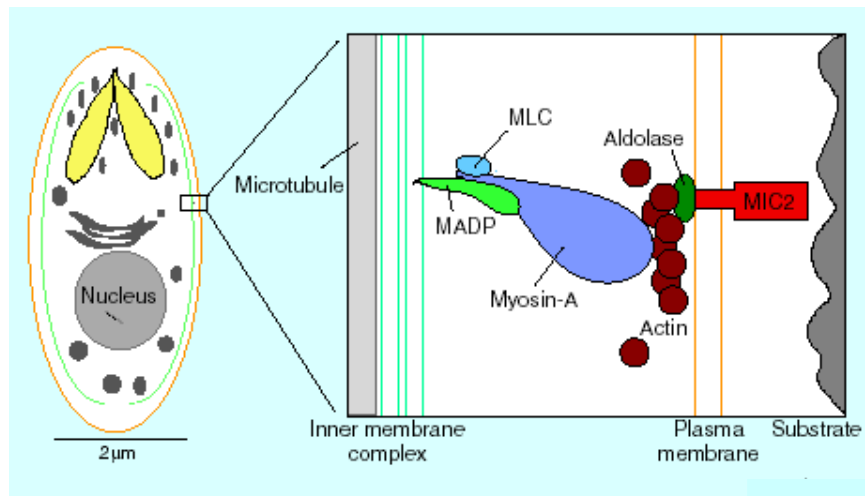


Abbildung 6: Modell der gleitenden Bewegung bei *T. gondii*

MLC: “myosin light chain”; MADP: “myosin-A docking protein”; MIC2: Micronemenprotein 2. Entnommen aus (Heintzelman MB, 2003)

I.6 Genetik von *T. gondii*

In den letzten Jahren konnten die Genomgrößen zahlreicher parasitärer Protozoen ermittelt werden, z.B. bei *Trypanosoma brucei* (Van der Ploeg *et al.*, 1984), *Plasmodium falciparum* (Kemp *et al.*, 1987), *Eimeria tenella* (Shirley *et al.*, 1990) und *Toxoplasma gondii* (Sibley and Boothroyd, 1992). Das nukleäre Genom von *T. gondii* umfasst circa 80 Mbp, die sich auf 11 Chromosomen verteilen. Durch die cytophotometrische DNA-Messung verschiedener Stadien von *T. gondii* konnte nachgewiesen werden, dass sich nur die Zygote (Oozyste) im diploiden Zustand befindet. Alle anderen Stadien (Sporozoiten, Tachyzoiten und Bradyzoiten) liegen im haploiden Zustand vor. Im Oktober 2003 wurde die Sequenzierung des gesamten *T. gondii* Genom abgeschlossen und veröffentlicht (<http://www.toxodb.org>). Es wurde festgestellt, dass die Gene von *T. gondii* mehr Introns als die von Plasmodium oder Cryptosporidium enthalten, was eins der großen Probleme bei der Identifizierung der *T. gondii* Gene in der Datenbank darstellt (Kim and Weiss, 2004). Dagegen enthalten die meisten *T. gondii* Gene, die für Oberflächenantigene verantwortlich sind, sowie viele Gene, die für Mikronemen, Rhoptrien und „dense granula“-Protein kodieren, weniger Introns als die anderen Haushaltgene (Kim and Weiss, 2004).

Neben dem Kerngenom konnten bei den Apicomplexa zwei weitere, extranukleäre Genome identifiziert werden:

Im Apicoplast, einem chloroplastenartigen Organell, befinden sich ein zirkuläres 35 kb großes Genom. Der Apicoplast ist durch eine sekundäre Endosymbiose mit einer Grünalge entstanden und ist als typisches Merkmal des Unterstammes der Apicomplexa definiert worden (Kohler *et al.*, 1997). Hier ist zu berücksichtigen, dass *Cryptosporidium parvum* während seiner Divergenz von den anderen Apicomplexa, seinen Apicoplast verloren hat. Wie auch bei anderen extrachromosomalen Genomen fand im Apicoplasten im Laufe der Evolution ein Gentransfer vom Plastid in den Nukleus statt, so dass viele Gene, die im Nukleus kodiert werden ihren phylogenetischen Ursprung im Vorläufer des Apicoplasten. Die Funktion des Apicoplasten beschränkt sich nach Verlust der Photosynthese während der Evolution hauptsächlich auf die Biosynthese von Isoprenoiden, Fettsäuren und aromatischen Aminosäuren (Fichera and Ross, 1997; Kohler *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1998; Kim and Weiss 2004). Fichera und Roos (1997) vermuten ferner eine Rolle des Apicoplasten bei der Etablierung der Parasitophoren Vakuole während der Wirtszellinvasion.

Auf dem Apicoplast-Genom wurde neben Enolase, Glukose-6 phosphat-Isomerase und Hsp60 (Soldati, 1999) viele rRNA Gene identifiziert (Kim und Weiss, 2004). Jüngste Arbeiten haben gezeigt, dass die Parasiten *T. gondii* und *Plasmodium falciparum* in der Lage sind, das in Chloroplasten vorkommende Monogalactosyldiacylglycerol und Digalactosyldiacylglycerol zu synthetisieren (Maréchal *et al.*, 2002). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Epitope von Proteinen des Apicoplasten mit denen von Chloroplasten-Proteinen aus Landpflanzen verwandt sind (Maréchal *et al.*, 2002). Die Replikation des Apicoplasten ist für das Überleben des Parasiten unverzichtbar und damit ein geeignetes Ziel für die Chemotherapie z.B. mit Fluoroquinolon, Chloramphenicol und Triclosan.

Parasiten von Stamm der Apicomplexa haben das kleinste bekannte mitochondriale Genom. Bei *T. gondii* besteht das mitochondriale Genom aus einem wiederholten Element von 6-7 kb und kodiert für einige Untereinheiten von Cytochrom b, Cytochrom c Oxidase und rRNA (Feagin JE. 2000; Feagin JE. 1992). Bemerkenswerterweise, kodiert das mitochondriale Genom bei den Apicomplexa keine tRNAs, daher müssen alle tRNAs, die für die mitochondriale Translation erforderlich sind, aus dem Cytosol importiert werden (Schneider and Marechal-Drouard, 2000).

Von den verschiedenen Stadien von *T. gondii* existieren EST-Datenbanken (Expressed Sequence Tag) von mehr als 60.000 EST (Ajioka *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003). Diese ESTs sind durch Klonierung und Sequenzierung von cDNA-Abschnitten entstanden und stellen somit Kopien der mRNA, also tatsächlich exprimierter Gene dar. Die ESTs sind unter der Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html> zusammengefasst. Da das Genom von *Toxoplasma* viele Introns enthält, kommt der Sequenzierung von ESTs besondere Bedeutung bei der Identifizierung von *Toxoplasma* Genen zu. Durch Vergleich mit bestehenden Datenbanken anderer Organismen konnte schon eine Reihe von Proteinen identifiziert werden. Durch den Vergleich der ESTs aus verschiedenen Stadien konnten auf diese Weise stadienspezifisch exprimierte Gene identifiziert werden.

Bei *T. gondii* sind Promotorstrukturen noch nicht besonders gut untersucht. Konventionelle cis-wirkende eukaryontische Promotorelemente wie die TATA-Box oder das SP1 Motiv konnten bisher in keiner 5'- untranslatierten Region UTR von *T. gondii* gefunden werden (Dyran *et al.*, 1985; Mitchell and Tjian, 1989). Analysen der 5'-UTR Sequenzen mehrerer Gene von *T. gondii* haben ein hoch konserviertes Heptanukleotidmotiv T/AGAGACG identifiziert (Soldati and Boothroyd, 1995; Ajioka *et al.*, 2001), das wahrscheinlich die Funktion der *cis-acting* Motive

übernimmt. Dieses Motiv kommt auch in dem 27 bp Element vor, das in sechs Wiederholungen als Tandems im 5'-UTR von SAG1 den Startpunkt der Transkriptionsinitiation festlegt (Soldati and Boothroyd, 1995). Promotor-Expressionsstudien mit Chloramphenicol-Acetyltransferase als Reporterprotein ergaben, dass eine Deletion des Heptanukleotidmotivs, das dem Startcodon am nächsten ist, den größten Effekt auf die CAT Aktivität zeigt (Soldati and Boothroyd, 1995; Mercier *et al.*, 1996). Die Anzahl und die Position dieser Heptanukleotidmotive sind in den untersuchten Genen sehr variabel, ebenso ihre Orientierung, die direkt oder invertiert sein kann.

I.7 Genetische Manipulation von *T. gondii*

Neben seiner einfachen Kultivierbarkeit hat sich *T. gondii* vor allem durch die Existenz zahlreicher Methoden der genetischen Manipulation als ein Modellorganismus für die Gruppe der Apicomplexa etabliert (Sinai *et al.*, 1997). Die Analyse verschiedener Prozesse wie Proteintransport oder Organellen-Biosynthese sind bei *T. gondii* durch die Fusionierung von Proteinen mit verschiedenen Epitopen wie GFP, c-Myc oder HA möglich geworden. Auch Markerproteine für die Lokalisation von Proteinen in *T. gondii* sind mittlerweile verfügbar. So lassen sich β -Galaktosidase exprimierende Parasiten sowohl in Zellkultur, als auch im Gehirn chronisch infizierter Mäuse leicht nachweisen (Seeber and Boothroyd, 1996; Dao *et al.*, 2002). Bei *T. gondii* ist das Studium der biologischen Funktion verschiedener Proteine, die bei den anderen Apicomplexa-Spezies schwach exprimiert sind, möglich geworden. Viele Proteine aus *Plasmodium* wie das „sporozoite circumsporozoite protein“ (CSP) konnten in *T. gondii* gut untersucht werden. Das Ziel war ein Impfantigen gegen Malaria aus *Toxoplasma* zu isolieren, da viele Gene bei *Plasmodium* aufgrund des hohen A/T Gehalts des Plasmodium Genoms nicht überexprimiert werden konnten (Kim and Weiss, 2004).

Toxoplasma ist das erste obligat intrazelluläre Protozoon das mit exogener DNA transformiert wurde (Donald and Ross, 1993; Soldati and Boothroyd, 1993). Es wurden bei *T. gondii* zwei Typen von Transfektionen durchgeführt: zum einem die transiente Transfektion, wobei die Plasmid-DNA extrachromosomal bleibt und mit der Teilung der Parasiten verloren geht, da die verwendeten Plasmide keinen Replikationsursprung für die autonome Vermehrung in *T. gondii* besitzen. Zum anderen wird bei der stabilen Transfektion die linearisierte Plasmid-DNA durch nicht homologe Rekombination ungerichtet ins Genom integriert. Durch homologe Rekombination kann die Integration des Plasmides gezielt erreicht werden. Dies ist lediglich

abhängig von der Größe der flankierenden Regionen (Donald and Roos, 1994). Eine Reihe von Markern wurde zur positiven und negativen Selektion auf stabile Transformanten entwickelt, wie das Bleomycin Resistenzgen (*ble*), das Tryptophan Gen (*trp*) (Donald and Ross, 1993; Kim *et al.*, 1993; Sibley *et al.*, 1994; Messina *et al.*, 1995; Soldati *et al.*, 1995; Donald *et al.*, 1996), das Dihydrofolatreduktase-Thymidilat-synthase Gen (*dhfr-ts*) (Donald and Ross, 1993), das Hypoxantine-Xanthine-Guanine-Phosphoribosyl-Transferase Gen (*hxgprt*) (Donald *et al.*, 1996) und das Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen (*cat*) (Kim *et al.*, 1993). Die Wirkung von Chloramphenicol auf *T. gondii* ist etwas verzögert, wodurch die Parasiten etwa 20 bis 25 Teilungen durchlaufen müssen, also etwa dreimal den Wirtszellrasen lysiert haben, bevor die Selektion überhaupt einsetzt (Kim *et al.*, 1993).

Da das Genom der Tachyzoiten haploid ist, wurden durch homologe Rekombination und mit der Anwendung von Selektions-markern viele nicht-essentielle Gene abgeschaltet und „Knock-out“ Parasiten erzeugt. Die Etablierung zusätzlicher Methoden, wie der Entwicklung eines stabilen episomalen Vektors (Black and Boothroyd, 1998) und der Expression von Rekombinase Cre (Brecht *et al.*, 1999) erlaubt eine genauere Untersuchung der Funktion eventuell essentieller Gene. Eine weitere Möglichkeit zum Ausschalten von Genen bei *T. gondii* stellt die zweistufige „hit-and run“ Mutagenese dar (Donald and Ross, 1998). Außerdem kann durch „ribozyme-modified antisense RNA strategy“ auch die Menge an Genprodukt verringert werden (Nakaar *et al.*, 1999; Nakaar *et al.*, 2000; Nakaar *et al.*, 2003).

I.8 Zielsetzung der Arbeit

Als Verursacher der Toxoplasmose bei immunsupprimierten Patienten und bei Neugeborenen hat *T. gondii* in den letzten Jahren an medizinisch-klinischer Bedeutung gewonnen. Aus biologischer Sicht ist bei *Toxoplasma gondii* insbesondere die Stadienkonversion von Interesse, ferner die Fähigkeit zur latenten Infektion mit der Möglichkeit der Reaktivierung. Dabei sind Toxoplasmen auch ein interessantes Modell für Parasiten, die sich zumindest teilweise dem Zugriff des Immunsystems entziehen.

Für das Verständnis der Pathogenese bei der Toxoplasmose ist die Identifikation von Genen bei *T. gondii* aus mehreren Gründen von großem medizinischen Interesse. Hierdurch können z.B. neue potentielle Ziele für Medikamente identifiziert werden und neue Antigene für diagnostische und

therapeutische Strategien gefunden werden. Ein weiteres Ziel ist es, einen Impfstoff gegen Toxoplasmen zu entwickeln.

Um mögliche neue immunreaktive Antigene bei *T. gondii* zu isolieren, wurde im Rahmen einer Doktorarbeit (1998) in unserer Arbeitsgruppe eine cDNA-Expressionsbank in dem Bakteriophagen Lambda Vektor „λExCell“ konstruiert. Zum Screening wurden humane Antiseren, die einen besonders hohen Antikörpertiter gegen *T. gondii* aufweisen, eingesetzt. Diese führten neben der Identifizierung vom schon bekannten Genen wie GRA1 und ROP2, zur Isolierung von drei unbekannten Genen, deren Expressionsprodukte die stärkste Reaktivität mit den humanen Antikörpern zeigten: H4, B10 und B4.

Während H4 als MIC5 (Brydges SD *et al.*, 2000) und B10 als GRA9 (Adjogble *et al.*, 2004) identifiziert werden konnten, ist B4 noch zu keiner Protein Gruppe zugeordnet worden.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte mittels molekularbiologischen Untersuchungen die genomische Organisation von B4 im Detail untersucht werden. Der wichtigste Aspekt dabei war es, die funktionellen Eigenschaften dieses Gens zu ermitteln. Um das Protein charakterisieren zu können, sollten rekombinantes B4-Protein und Antikörper gegen dieses Protein hergestellt werden. Dadurch sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen die Lokalisation des B4-Proteins bei Tachyzoiten als auch bei Bradyzoiten geklärt werden. Ferner sollte mittels Zellfraktionierung die zelluläre Verteilung des Proteins analysiert werden. Neben den molekularbiologischen Analysen sollte in dieser Arbeit auch die Bedeutung des B4-Antigens für diagnostische Untersuchungen geklärt werden.

Um die Funktion des B4-Proteins zu charakterisieren, wurde bei Tachyzoiten das B4-Protein überexprimiert. Die erzeugten Mutanten wurden sowohl auf ihre „Gliding-Motility“, Invasion als auch auf ihre Proliferation untersucht. Durch Deletion des B4-Gens sollte untersucht werden, ob das Gen für das Wachstum des Parasiten essentiell ist.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien

(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
Chloramphenicol:	Sigma, St. Louis, USA
Coomassie Blue G:	Sigma, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue R250:	Serva, Heidelberg
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
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert Cytogen:	Gibco
Glutamin (200 mM):	Gibco
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 ₂ HPO ₄ :	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid:	Merck, Darmstadt
KanaMycin:	Boehringer, Mannheim
KH ₂ PO ₄ :	Merck, Darmstadt
Kristallviolett:	Merck, Darmstadt
LB-Agar:	Gibco BRL, Eggenstein
LB-Medium:	Gibco BRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid:	Merck, Darmstadt
Milchpulver Oxoid:	Basingstoke, GB
N-(1-Naphthyl) ethylenediamine:	Sigma, St. Louis, USA
N,N, N, N'-tetramethylethylenediamin (TEMED):	Merck, Darmstadt
NaOH:	Merck, Darmstadt
Natriumacetat:	Merck, Darmstadt
Natriumazid:	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat:	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid:	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat:	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS):	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat:	Merck, Darmstadt
n-Butanol:	Merck, Darmstadt
N-Laurylsarkosin:	Sigma, St. Louis, USA
Parafinöl:	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd:	Sigma, St. Louis, USA
Phenol/Chloroform:	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure 85%:	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid:	Sigma, St. Louis, USA
Salzsäure:	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure:	Merck, Darmstadt
Silbernitrat:	Merck, Darmstadt
Thioglykolat:	Sigma, St. Louis, USA

Thioharnstoff:	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris):	Merck, Darmstadt
Triton X-100:	Sigma, St. Louis, USA
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

II.1.2 Sonstige Materialien und Geräte

Basic-96-Harvester (Zellerntegerät):	Zinser analytic Skatron, Frankfurt
BetaPlate Scint (Szintillationsflüssigkeit):	LKB Wallac, FIN
CO ₂ -begaster Brutschrank (Heraeus B5060 EK/CO ₂):	Heraeus, Hanau
ELISA-Photometer:	Tecan
Nylonmembran Hybond N+:	apbiotech, Freiburg
Glasfaserfilter (Preprint Filtermat):	LKB Wallac, FIN
Kodak X-OMAT, AR Film, XAR-5 Kodak:	Rochester, USA
Nitrozellulosemembran „Protran“ 0,45 µm:	Schleicher & Schüll, Dassel
Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A):	Flow Laboratories, 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.1.3 Oligonukleotide, Plasmide und verwendeten Antikörper

II.1.3.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die PCR wurden von MWG Biothec AG, Ebersberg hergestellt.

Pn1:	5' AGAAGAGAAGAGTGCATGCAGGGAAGG 3'
Pc1:	5' CAAGGGAGAAGCAAGTGAGAGTGAGAA 3'
EcoRI-B4:	5' CCCC GAATTCATGGAAGAAGTTTCACTGTGCG 3'
B4-XhoI:	5'CCCCCTCGAGCTTTTAACTTTTGTCAAAGTCGT 3'

βTub1-N:	5' CCCGTTCCCTCGTCTCC 3'
βTub1-C:	5' CTCGGTGAATTCCATCTCGT 3'
SAG1-N:	5' GCCGTTGTGCAGCTTTCCGTTCTTC 3'
SAG1-C:	5' ATCCCCGTCCACCAGCTATCTTCT 3'
B4-NsiI:	5' CCCCATGCATCTTTTAACTTTTGTCAAAGTCG 3'
BglII-LDH1:	5' ATCAGATCTAAAATGGCACCCGCACTTGTGCAG 3'
LDH1-AvrII:	5' TCTCCTAGGCGCCTGAAGAGCAGCAACCG 3'
ApaI-Fr 5':	5' AAAAGGGCCCTCAGAGAGCAAAATGCAATT 3'
Fr-5'-ClaI:	5' AAAAATCGATCTGTTGCTGCAGAAAAGCAAGGGAT 3'
SpeI-Fr 3':	5' AAAAAGTAGTCTGCCGTTTGTGGAGGAGAGAACGA 3'
Fr-3'-NotI:	5' AAAAGCGGCCGCTGTAGGAGAGAACAGGAT 3'
BglIII-B4:	5' CCCCAGATCTATGGAAGAAGTTTCACTGT 3'
B4-SpeI:	5' CCCCACTAGTCTTTTAACTTTTGTCAAAGTCGT 3'

II.1.3.2 Plasmide

pGEX-4T-His:	Pharmacia GST-Fusionsprotein für bakterielle Expression
pEGFP-C1:	Clontech, San Diego, USA
pTub8-GFP:	freundliche Gabe von Soldati
pTubyfp-yfp/sagCAT:	freundliche Gabe von Boris Stripen, Athens, USA
pTub-Myc:	freundliche Gabe von Boris Stripen, Athens, USA
pTub1-CAT:	freundliche Gabe von Soldati, Schweiz
pGEX-GST-B4-His:	in dieser Arbeit hergestellt
pTub8-B4-GFP:	in dieser Arbeit hergestellt
pTub-B4-YFP:	in dieser Arbeit hergestellt
pTub-B4-Myc:	in dieser Arbeit hergestellt
pTub-LDH1-Myc:	in dieser Arbeit hergestellt
pB4-EGFP:	in dieser Arbeit hergestellt
pTub1-CAT-3'B4:	in dieser Arbeit hergestellt
pTub1-5'B4-CAT-3'B4:	in dieser Arbeit hergestellt

II.1.3.3 Verwendete Antikörper und Seren

Kaninchen-anti-B4 ^{AS 60-70} Serum:	Eurogentec, Belgien
mAk Maus-anti-Myc-Tag:	Roche Diagnostics, UK
Kaninchen -anti-GFP:	Clontech, San Diego, USA
mAk Maus-anti- <i>T.g.</i> -LDH1:	(Reichmann <i>et al.</i> , 2001)
mAk Maus-anti- <i>T.g.</i> -4F8:	(Fischer <i>et al.</i> , 1997)
mAk Maus-anti- <i>T.g.</i> - SAG1:	M-F . Cesbron-Delauw, Grenoble, Frankreich
mAk Maus-anti- <i>T.g.</i> - GRA2:	M-F . Cesbron-Delauw, Grenoble, Frankreich
mAk Maus-anti- <i>T.g.</i> -MIC2:	J-F. Dubremetz, Montpellier, Frankreich

II.1.4 Restriktionsenzyme

<i>ApaI</i> :	Promega, Madison, USA
<i>AvrII</i> :	NEB, Beverly, USA
<i>BamHI</i> :	Invitrogen, Karlsruhe
<i>BglII</i> :	NEB, Beverly, USA
<i>ClaI</i> :	Invitrogen
<i>EcoRI</i> :	Promega, Madison, USA
<i>EcoRV</i> :	Promega, Madison, USA
<i>HindIII</i> :	Promega, Madison, USA
<i>NotI</i> :	NEB, Beverly, USA
<i>NsiI</i> :	NEB, Beverly, USA
<i>PacI</i> :	NEB, Beverly, USA
<i>SacI</i> :	NEB, Beverly, USA
<i>SpeI</i>	NEB, Beverly, USA
<i>XhoI</i> :	Promega, Madison, USA

II.1.5 Sonstige Enzyme

Ampli Taq DNA Polymerase:	Perklin-Elmers
Dnase I:	Roche, Mannheim
Expand-High-Fidelity-DNA-Polymerase:	Roche, Mannheim
Proteinkinase K:	Roche, Mannheim
RNase A:	Roche, Mannheim

T ₄ DNA-Ligase:	Roche, Mannheim
Trypsin:	Gibco BRL, Eggenstein

II.1.6 Größenstandards

II.1.6.1 Größenstandards für Proteine

SeeBlue Plus 2 Pre-stained Standard :	Invitrogen, Karlsruhe
Mark12™ Standard:	Invitrogen, Karlsruhe

II.1.6.2 Größenstandards für Nukleinsäuren

Lambda DNA / <i>EcoRI</i> + <i>Hind III</i> Marker:	Promega, USA
1kb DNA Leiter:	BRL, Eggenstein
100bp DNA Leiter:	BRL, Eggenstein
0,24-9,5kb RNA Leiter:	BRL, Eggenstein

II.1.7 Molekularbiologische Kits

Advantage RT-for-PCR Kit:	BD Biosciences, USA
QIAquick-spin PCR Purifikation Kit:	Qiagen, Hilden
High Pure PCR Product Purification Kit:	Roche, Mannheim
Oligotex- mRNA-Kit:	Qiagen, Hilden
High Pure Plasmid Isolation Kit:	Roche, Mannheim
Gel Extraktion Kit:	Qiagen, Hilden
Digoxigenin PCR Probe Synthesis System:	Roche Biochemicals

II.1.8 Verwendeten Organismen

II.1.8.1 Bakterienstämme

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

E. coli DH5 α : F⁻; *endA1*, *hsdR17*(r_k-m_k+), *deoR*, *supE44*, *thi-1*, *relA1*, *recA1*, *gyrA96*, Δ (*lacZYA-argF*) U169 (ϕ 80dlacZ Δ M15).

E. coli J109: K-12 derivative, *recA1*, *supE44*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA96*, *relA1*, *thi* (*lac-proAB*).

II.1.8.2 *Toxoplasma gondii* Stämme

RH:	Sabin, 1941, ATCC, Manassas, USA
RH <i>hxgprt</i> :	Donald <i>et al.</i> , 1996, ATCC, Manassas, USA
DX :	Schlüter <i>et al.</i> , 1991, Institut für Medizinische Pathologie, Bonn
RH-YFP-YFP:	freundliche Gabe von Boris Stripen, Athens, USA
Bk:	Winser <i>et al.</i> , 1948, Seitz, Parasitologie, Bonn
RH-B4-Myc:	in dieser Arbeit hergestellte Mutanten
RH-B4-YFP:	in dieser Arbeit hergestellte Mutanten
RH-B4-GFP:	in dieser Arbeit hergestellte Mutanten

II.1.8.3 Zelllinien

HFF:	Kinderklinik UKD, Düsseldorf, Deutschland
86HG39 :	Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf
EGFP:	in dieser Arbeit hergestellte Mutanten
B4-EGFP:	in dieser Arbeit hergestellte Mutanten

II.1.8.4 Mausstämme

MNRI-Mäuse:	Tierversuchsanlage Düsseldorf
-------------	-------------------------------

II.1.9 Puffer, Medien und Lösungen

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben mit Reinstwasser angesetzt. Puffer und Lösungen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten, sowie Lösungen und Puffer für die Zellkultur werden für 60 min bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert.

LB-Medium:	1% Trypton 0,5% Hefe Extrakt 0,5% NaCl
LB-Platten:	LB-Medium 1,2% Bacto-Agar

Antibiotikumstammlösungen:	Ampicillin (Na-Salz) 50 mg/ml in H ₂ O KanaMycin: 25 mg/ml in Ethanol Chloramphenicol: 50 mg/ml in Ethanol Genetecin 1 mg/ ml (G418)
Zell-Medium:	IMDM 5% oder 10% FCS 25 µg/ml Gentamycin
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA
TBE-Puffer:	89 mM Tris-HCl, pH 7 89 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
20 x SSC:	0,3 M Natriumcitrat 3 M Natriumchlorid
Cytomix-Puffer:	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ pH 7,6 25 mM HEPES, pH 7,6 2 mM EDTA 5 mM MgCl ₂ 2 mM ATP, Frisch zugegeben 5 mM Glutathion, Frisch zugegeben

II.2 Methoden

II.2.1 Mikrobiologischen Methoden

II.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli* (*E.coli*)

Der gewünschte Bakterienstamm wurde von einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte oder direkt aus Glycerinkultur in sterilem LB-Medium, welches mit dem Selektionsantibiotikum versetzt wurde, angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskulturen wurden zum Animpfen größerer Kulturen, zur analytischen Plasmidisolierung oder zum Anlegen von Stammkulturen verwendet. Zur Herstellung von Stammkulturen wurden 1 ml der Übernachtskultur bei 3500 rpm 4 min abzentrifugiert und in 200 µl LB-Medium plus 50% Glycerin resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

II.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen erfolgte nach der RbCl-Gefrierzellenmethode. Von einer *E. coli* Kultur ($OD_{600} = 0,5-0,6$) wurden 50 ml für 15 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und in 20 ml RF1-Lösung (0,1 M RbCl, 0,05 M MnCl₂, 0,03 M Kaliumacetat, 0,01 M CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach einer 1-2-stündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml RF2-Lösung (0,01 M MOPS, 0,01 M RbCl, 0,075 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 6,8) aufgenommen, für weitere 15 min gekühlt und in 150 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

II.2.1.3 Transformation kompetenter *E. coli*

Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurden die kompetenten Zellen zunächst vorsichtig auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl Zellsuspension mit 2-3 µl DNA Lösung (ca. 50-500 ng Plasmid-DNA) versetzt und dann 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die *E. coli* einem 1,5-2 min während Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend weitere 2 min auf Eis inkubiert, bevor 900 µl LB-Medium zugegeben wurden. Die Ansätze wurden dann 1 Stunde bei 37°C und 500 rpm inkubiert. Jeweils 50 µl jedes Ansatzes wurden auf je eine LB-Agarplatte ausplattiert, die das Antibiotikum enthielt, das dem Resistenzgen des transformierten Plasmids entsprach.

II.2.2 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

II.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit hoher Reinheit

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Das Prinzip des Kits beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen. Plasmid-DNA wird freigesetzt, während die chromosomale DNA in einem Präzipitat aus Zellwandtrümmern und Protein eingeschlossen bleibt. In Anwesenheit hoher Konzentrationen eines chaotropen Salzes bindet die gelöste Plasmid-DNA spezifisch an die Glasfasermatrix der Trennsäulchen. Bei dem anschließenden Waschschrift wird die DNA von Salz, Protein und anderen Verunreinigungen befreit und schließlich mit Niedersalzsäure-Puffer oder Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

Größere Mengen DNA wurden aus einer 100-150 ml Bakterienkultur nach dem Protokoll für Maxi-Präparationen von Qiagen aufgereinigt.

II.2.2.2 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer *T. gondii* DNA wurden zu 1×10^9 Parasiten 400 µl DNA-Lysepuffer mit 0,1 mg/ml RNase A zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde Proteinase K mit einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben und bei 50°C über Nacht inkubiert. Es folgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Aus dem Überstand wurde die genomische DNA mit eiskaltem Ethanol gefällt und danach mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in 200 µl *aqua dest.* aufgenommen.

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

II.2.2.3 Phenol-/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde als Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren und Proteinen verwendet. Dazu wurde der Probe Phenol/Chloroform im gleichen Volumen zugegeben. Nach kurzem Schütteln erfolgte eine ca. 3-

minütige Zentrifugation bei 15000 rpm, RT. Die obere Phase wurde überführt, die untere verworfen.

Um die DNA von den restlichen Phenolresten zu befreien, wurde das gleiche Volumen Chloroform zugegeben, und nach kurzem Schütteln erfolgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm, RT. Die obere Phase wurde überführt, die untere Phase verworfen.

II.2.2.4 Alkoholfällungen von Nukleinsäuren

Gibt man Ethanol zu einer DNA-Lösung hinzu, so bildet sich in Anwesenheit monovalenter Kationen ein DNA-Präzipitat, das sich durch Zentrifugation sedimentieren lässt. Das Verfahren wird z.B. angewandt, um Nukleinsäure-Lösungen zu konzentrieren und die nach der Vorreinigung durch Phenol-Extraktion verbliebenen Phenolreste zu entfernen.

Die DNA-Lösung wurde mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit zweieinhalbfachem Volumen eiskaltem absoluten Ethanol und einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) vermischt und die DNA bei -70° C für mindestens eine Stunde gefällt. Nach anschließender Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min wurde die DNA mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und im gewünschten Volumen *Aqua dest.* resuspendiert.

II.2.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Banden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mittels des Gel Extraktion Kit (Qiagen) aus dem Agarosegel eluiert. Die Elution beruht dabei auf der Bindung der durch Auflösen der Agarose freigesetzten DNA an Glasmilch unter chaotropen Bedingungen. Durch mehrmaliges Waschen mit ethanolischer Lösung wurden Verunreinigungen entfernt, bevor die DNA bei geringer Ionenstärke eluiert wurde.

II.2.2.6 Isolierungen von Gesamt-RNA

Für alle Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich Lösungen verwendet, die mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DPEC) behandeltem und anschließend autoklaviertem Wasser angesetzt worden waren. Sämtliche Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen durchgeführt.

Gesamt-RNA wurde durch Aufschluss der Zellen mit Guanidinisothiocyanat (GSCN) und anschließender Ultrazentrifugation des Lysats auf einem Cäsiumchlorid-Dichtekissen gewonnen. Die GSCN Methode nutzt die Tatsache aus, dass RNA in Cäsiumchlorid eine höhere Schwebedichte hat als andere Zellbestandteile und deshalb durch Zentrifugation pelletierbar ist,

während DNA, Lipide und Proteine im Überstand verbleiben. 10^9 zweifach mit PBS gewaschene Zellen wurden mit 4 ml GSCN-Lösung in einem Greiner Röhrchen lysiert und die Lösung mit 3 ml DEPEC-Wasser aufgefüllt. In einem Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) wurden 3 ml des Cäsiumchlorid-Dichtekissens vorlegt und dieses mit Lysat überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation (Ultrazentrifuge Beckman Optima L60) bei $150000 \times g$, 23°C für 16 Stunden (Rotor SW41Ti, Beckman). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Röhrchen 2 cm über dem Boden mit einem heißen Skalpell abgeschnitten. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und dann in 50 μl 10 mM Tris / DEPC-Wasser, pH 7,5 gelöst. Die Konzentration und 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.

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

DEPC- H_2O : *Aqua dest.* wurde mit 0,1 % DEPC versetzt über Nacht bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert.

II.2.2.7 Isolierung von mRNA

Zur Anreicherung von messenger RNA (mRNA) wurde das Oligotex-mRNA-Kit (Quiagen) benutzt. Gesamt RNA wurde 1/1 mit 2x Bindungspuffer gemischt und mit 6 μl Oligotex Suspension pro 100 μg RNA 3 min bei 65°C und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Die Oligotex Partikel wurden abzentrifugiert (2 min, $14000 \times g$) und 2x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution der mRNA wurde mit zweimal 5 μl Elutionspuffer (vorgewärmt bei 70°C) je eingesetzten 100 μg Gesamt-RNA durchgeführt.

II.2.2.8 Konzentrationbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA, sowie die Reinheit der Proben kann photometrisch bestimmt werden. Dazu wird die Extinktion der Probe in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei Wellenlängen von $\lambda = 260$ und $\lambda = 280$ nm im Spectrophotometer (Pharmacia LKB Ultraspec Plus, Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA 50 $\mu\text{g/ml}$, bei einzelsträngiger DNA und RNA 40 $\mu\text{g/ml}$. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu der Extinktion bei 280 nm zeigte die Reinheit der Präparation. Bei sauberer Präparation sollte das Verhältnis 1,8 bis 2,0 betragen. Bei Kontaminationen mit Proteinen oder Phenol ist das Verhältnis deutlich niedriger.

II.2.3 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

II.2.3.1 Native DNA-Agarosegele

Die analytische Auftrennung von Nukleinsäuren in 0,8-1% (w/v) Agarosegelen wurde genutzt, um Fragmentgrößen restringierter DNA und PCR-Produkten zu ermitteln. Die Herstellung der Gele sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in 0,5 % TBE- Puffer unter Zusatz von Ethidiumbromid (0,1 $\mu\text{g/ml}$). Die DNA Ansätze wurde vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 6 V/cm aufgetrennt.

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

II.2.3.2 Denaturierende RNA-Agarosegele

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA nach der Größe, ist es notwendig die RNA zu denaturieren, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. In dieser Arbeit wurden Formaldehydagarosegele verwendet; da Formaldehyd kovalent mit den Aminogruppen von Adenin, Cytosin und Guanin reagiert und so Basenpaarungen verhindert. Zusätzlich wurde den RNA-Proben Formamid zugesetzt, das Wassertoffbrückenbindungen aufbricht und so den Angriff des Formaldehyds an den Basen ermöglicht. Da Formaldehyd leicht zu Ameisensäure oxidiert und diese zur Hydrolyse der RNA führt, musste darauf geachtet werden, dass der pH-Wert der verwendeten Formaldehydlösung nicht unterhalb von 4,0 lag.

1,2 g Agarose wurden in 81 ml H₂O in einem sterilen Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen wurden 11 ml 10 x MOPS-Puffer und 20 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. Die zu analysierende *T. gondii* m-RNA wurde in RNA-Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 68°C denaturiert und bis zum Auftragen der Probe auf Eis gestellt. Die RNA-Probe wurde kurz vor der Auftrennung im Formaldehydgel mit 1/10 Volumen Auftragspuffer (50% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, pH 8, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25 (w/v) Xylenzyanol) versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 80 V für 4 bis 6 Stunden. Bevor das Gel unter UV-Licht photographiert wurde, wurde der Formaldehyd durch dreimaliges Waschen für 15 min in DEPC-H₂O entfernt.

10x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS
	50 mM NaAcetat pH 7,0
	10 mM EDTA
RNA-Probenpuffer:	7 % (v/w) Formaldehyd
	50 % (v/v) Formamid
	1 x MOPS

II.2.4 Modifikation und Rekombination von DNA

II.2.4.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Moleküle sequenzspezifisch in diskrete Fragmente zerschneiden können. Die Spaltung von Plasmid- bzw. Gesamt-DNA erfolgt nach Empfehlung des Herstellers der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Eine Inaktivierung der Enzyme erfolgt durch wiederholtes Einfrieren bei -20°C oder durch eine Inkubation bei 65°C über 20 min.

II.2.4.2 DNA-Ligation

Das Prinzip der Ligation ist die kovalente Verknüpfung der 3' und 5'-Enden verschiedener DNA-Stränge. Die DNA-Konzentration von einzufügendem DNA-Fragment und geschnittenem Vektor wurde photometrisch bestimmt und bei einem Volumen des Ligationsansatz von 20 µl bei einer gesamt DNA Menge von 500 ng das Verhältnis Vektor zu einzufügendem DNA-Fragment etwa 1:4 gewählt. Pro Ligationsansatz wurde 1U T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) mit dem

entsprechenden Ligasepuffer zu der DNA-Mischung addiert, das Restvolumen mit H₂O aufgefüllt und 2 Stunden bei Raumtemperatur, alternativ bei 16°C über Nacht inkubiert.

Nach Abschluss der Ligation wurde der Reaktionsansatz ohne weitere Behandlung sofort zur Transformation kompetenter Zellen (II.2.1.2) eingesetzt.

Zu jeder Ligation wurde eine Negativkontrolle angesetzt, bei der der linearisierte, dephosphorylierte Vektor ohne Insert mit Ligase behandelt wurde.

II.2.4.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur schnellen spezifischen Detektion und Amplifizierung von DNA-Molekülen definierter Sequenz. Bei der PCR wird durch den wiederholten Ablauf von Strangtrennung, Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und DNA-Synthese mit hitzestabiler DNA-Polymerase eine exponentielle Synthese von DNA-Molekülen aus Desoxynukleosidtriphosphaten erreicht.

In einem Ansatz von 100 µl waren folgende Reagenzien enthalten: 1–4 U Taq-Polymerase, 10 µl 10 × PCR-Puffer, 2 µl dNTPs (je 10 mM), je 50 pmol der entsprechenden Primer und etwa 200 ng Plasmid-DNA bzw. 1 µg genomische DNA als Matrize. Zur Synthese von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke wurde Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*), für Klonierungen „expand high fidelity“ DNA-Polymerase (aus *Pyrrococcus furiosus*) verwendet.

Der Reaktionsansatz wird im Thermocycler dem jeweils passenden Programm unterzogen. Nach Denaturierung bei 95°C für 4 min wurde die DNA in 25 bis 35 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus bestand aus zwei Minuten 95°C, eine Minute 60–65°C und eine Minuten 72°C. Zum Abschluss wurde der Elongationsschritt des letzten Zyklus um sieben Minuten bei 72°C verlängert und anschließend bei 4°C gelagert. Die amplifizierte DNA kann in der Agarose-Gelelektrophorese analysiert oder aufgereinigt und z.B. für eine Klonierung weiter verwendet werden

II.2.4.4 RT-PCR

Durch den Prozess der Reversen Transkription wird die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus einem mRNA-Template ermöglicht. Für die vorliegende Arbeit wurden für diesen Zweck eine RNA abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) aus dem Retrovirus *MLLV* (*moloney-murine leukemia virus*) und Oligo-(dT)18– Primer zum Binden an den 3′- Poly-A-Schwanz der mRNA benutzt. Alle Komponenten entstammten dem Advantage® RT-for-PCR-Kit (BD Bioscience, Heidelberg).

In einem ersten Schritt wurden 200 ng Gesamt-RNA mit 1 µl oligo(dT) in einem mit RNase-freiem Wasser aufgefüllten Gesamtvolumen von 13,5 µl für 2 min bei 70°C vorinkubiert, um das Anlagern des Primers an die mRNA-Moleküle zu ermöglichen. Anschließend wurden 6,5 µl eines Mastermixes hinzugefügt, der neben dem 5x RT-Puffer auch dNTPs, synthetischen RNase-Inhibitor und das Enzym *MLV*-Reverse Transkriptase enthielt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C wurde das Enzym durch Erhitzen für 5 min bei 98°C inaktiviert. Die cDNA wurde durch Zugabe von 80 µl H₂O 1:5 verdünnt und bis zur weiteren Nutzung bei –80°C gelagert.

II.2.5 Konstruktionen der Expressionsvektoren

II.2.5.1 Konstruktion des pGEX-B4-His Vektors

Das in den GEX-Vektoren genutzte GST-Gen stammt aus dem Plathelminthen *Schistosoma japonicum* und kodiert für ein GST-Protein mit einem Molekulargewicht von 27 kDa, die sich gut in *E.coli* exprimieren lässt (Smith and Johnson, 1988). GST ist ein ubiquitär verbreitetes Enzym, welches die Übertragung von Glutathion-Sulphydryl-Gruppen katalysiert. Nach erfolgter Induktion mit Isopropylthiogalaktosid (IPTG) wird die GST bzw. das GST-Fusionsprotein zytoplasmatisch gebildet. Die vollständige Sequenz von B4 wurde mittels PCR-Synthese erhalten, wobei DNA aus RH-Parasiten als Matrize diente. Als Primer wurde ein Oligonukleotid verwendet, das komplementär zum 5'-Ende der B4-Sequenz ist (Basenpaar 1 bis 22) mit 10 zusätzlichen Basenpaaren stromaufwärts, die eine künstliche *EcoRI*-Schnittstelle enthalten (Primer *EcoRI*-B4). Der Gegenprimer ist komplementär zum 3'-Ende von B4 (Basenpaare 472 bis 495) und hat eine Sequenzverlängerung von 10 Nukleotiden, die eine künstliche *XhoI*-Schnittstelle beinhalten (Primer B4-*XhoI*). Das Insert wurde über die *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstelle zwischen die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pGEX-4T-His inkloniert.

II.2.5.2 Konstruktion der pTub8-B4-GFP, pTub-B4-YFP und pTub-B4-Myc Vektoren

Für die Überproduktion von B4 in *T. gondii* wurden Vektoren hergestellt, welche die Expression eines B4-Fusionsproteins mit terminalen GFP, YFP oder Myc-Epitop ermöglichen.

Für die Herstellung des B4-GFP-Fusionsproteins wurde der Vektor pTub8-B4-GFP konstruiert. Hierfür wurde das Plasmid pTub8-GFP (freundliche Gabe von Soldati) mit den Enzymen *EcoRI* und *NsiI* geschnitten. Zwischen die entstandenen Schnittstellen wurde das B4-Insert eingefügt, das durch PCR-Synthese erhalten wurde. Als Matrize bei der PCR wurde genomische DNA aus

RH-Parasiten verwendet und als Primer die Oligonukleotide *EcoRI*-B4 und B4-*NsiI*, die eine künstliche *EcoRI* bzw. *NsiI*- Erkennungssequenz enthielten.

Zur Produktion eines Fusionsproteins bestehend aus B4 und YFP wurde der Vektor pTub-B4-YFP hergestellt. Ausgangsvektor war das Plasmid pTubYFP-YFP/sagCAT (freundliche Gabe von Boris). Dieses wurde mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *BglIII* verdaut. Mit dem Primerpaar *BglIII*-B4 und B4-*SpeI* wurde B4-cDNA amplifiziert und isoliert. Die Primer waren mit *BglIII* und *SpeI* Linkern versehen, so dass das PCR-Produkt in die *BglIII* und *SpeI* Schnittstelle des Vektors pTubYFP-YFP/sagCAT ligiert werden konnte. Dabei wurde der pTubB4-YFP Vektor erhalten.

Ferner wurde ein B4-Expressionskonstrukt mit Myc-Epitop am C-Terminus erzeugt. Dafür wurde das Insert des Plasmids pTubB4-YFP durch Verdau mit den *SpeI* und *BglIII* entfernt und in pTub-Myc Plasmid einkloniert. Dabei wurde das pTub-B4-Myc Plasmid erhalten.

Als Positivkontrolle wurde auch ein LDH1-Expressionskonstrukt mit Myc-Epitop am C-Terminus erzeugt. Mit dem Primerpaar *BglIII*-LDH1 und LDH1-*AvrII* wurde der LDH1 ORF amplifiziert, isoliert und in das vorher geschnittene Plasmid pTub-Myc mit *BglIII* und *AvrII* einkloniert.

II.2.5.3 Konstruktion des pB4-EGFP-Vektors zur Expression in humanen Zellen

Dazu wurde der Expressionsvektor pEGFP-C1 eingesetzt (Clontech). Das Plasmid pEGFP-C1 exprimiert das grün fluoreszierende Protein EGFP unter der Kontrolle eines starken konstitutiven CMV-Promotors, ohne dazu exogene Substrate oder Kofaktoren zu benötigen. Das vollständige B4-kodierende Bereich aus *T. gondii* (Stamm RH) wurde mit Primerpaaren *XhoI*-B4 und B4-*EcoRI* amplifiziert, sequenziert und in das pEGFP-C1 Plasmid einkloniert.

II.2.5.4 Zielvektor zur Generierung von B4-„knock-out“ Mutanten

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. Die Sequenzinformation der genomischen Sequenzen stromauf- und abwärts des B4-Lokus wurden nach abgeschlossener Sequenzierung des

T. gondii Genoms aus Genbanksequenzdaten (www.toxodb.org) entnommen. Mit dem Primerpaar (SpeI-Fr3') und (Fr-3'-NotI) wurde die 1582 bp der 3' stromabwärts liegenden B4 genomischen Sequenz amplifiziert, mit SpeI und NotI restringiert und in den ebenso geschnittenen Vektor pTub1-CAT (freundliche Gabe von Soldati, Schweiz) ligiert. Dabei entsteht der Zwischenvektor pTub1-CAT-3'B4. Danach wurden durch PCR-Synthese mit den Primern (ApaI-Fr 5') und dem Gegenprimer (Fr-5'-ClaI) die 5' flankierende Region der *T. gondii* B4-Gens mit einer Größe von 1582 bp erzeugt. Das PCR-Produkt wurde in den Zwischenvektor pTub1-CAT-3'B4 inkloniert, dabei entsteht das Plasmid pTub1-5'B4-CAT-3'B4. Durch analytischen Verdau und partielle Sequenzierung wurde das erhaltene „knock-out“-Konstrukt pTub1-5'B4-CAT-3'B4 auf Richtigkeit überprüft.

II.2.6 Markierungen von DNA

II.2.6.1 Herstellung der Sonden (DIG DNA Labeling Kit, Roche, Mannheim)

Die Markierung der DNA-Sonden mit Digoxigenin erfolgt mit Hilfe der PCR. Dabei wird ein Teil des dTTP durch DIG-11-dUTP ersetzt, das bei der Kettenverlängerung in die neu synthetisierten Fragmente eingebaut wird. Als Vorlage wurde Plasmid-DNA benutzt, deren Insert den zu markierenden Abschnitt enthält. Es wurden 5 µl 10 x Puffer, 5 µl dNTP-Mix für DIG-Labeling, 5 µl Digoxigenin-11-dUTP, je 2 µl der Primer (Pn1, Pc1) und 1 µl Taq-Polymerase mit der Matrize und H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt.

Gleichzeitig wurde eine Probe ohne DIG-11-dUTP angesetzt. Die Längenkontrolle erfolgte über eine elektrophoretische Auftrennung im Agarose-Gel. Das mit Digoxigenin markierte Fragment ist größer und läuft demzufolge langsamer durch das Gelgitter als das nicht markierte Fragment.

II.2.6.2 Qualitätskontrollen der Markierung der Sonde (Dot-Blot)

Die Dot-Blot Methode erlaubt einen schnellen Nachweis der Markierungseffizienz der Sonde. Die markierte Sonde wird in einer Verdünnungsreihe auf die Nylonmembran transferiert und mit UV-Licht fixiert. Der Nachweis erfolgte durch an eine, an Anti-Dig-Antikörper gekoppelte, alkalische Phosphatase (Dig-AP-Fab-Ak) und nachfolgender Chemolumineszenzmessung.

II.2.6.3 DNA-Sequenzierungen

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

II.2.7 Nukleinsäure-Übertragung auf Nylonmembranen

II.2.7.1 Southern-Blot Analyse von DNA

Mit diesem Verfahren wurden DNA-Fragmente, die durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, aus der Gelmatrix auf eine Trägermembran unter Beibehaltung des Trennmusters übertragen und immobilisiert.

Zuerst wurde die isolierte DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und in einem Standard-Agarose-Gel aufgetrennt. Das Agarose-Gel wurde dann zweimal 15 min in 0,2N HCl geschwenkt. Dabei entstehen Strangbrüche, was einen Transfer größerer DNA Fragmente erleichtert. Das Gel wurde zweimal mit H₂O gespült und zweimal 15 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) geschwenkt. Nach zweimaligem Spülen mit H₂O erfolgte eine Neutralisation durch Inkubation des Gels für zweimal 15 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris, 3 M NaCl, pH 8). Die Nylonmembran wurde auf Gelgröße zugeschnitten, 10 min in H₂O inkubiert und anschließend 15 min in 10 x SSC-Puffer equilibriert.

6 Lagen Filterpapier (Whatman 3 MM) wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten. Eine Glasplatte wurde auf die mit 10 x SSC-Puffer gefüllte Blot-Kammer gelegt und ein Streifen in 10 x SSC getränktes Filterpapier darüber gelegt, so dass die Enden in den Puffer eintauchten. Das Gel wurde auf Filterpapier gelegt und an den Seiten mit Spacern abgedichtet. Darauf wurden luftblasenfrei eine Plastikfolie mit Aussparung in Gelgröße, die vorbehandelte Nylonmembran, die 6 Lagen Filterpapier und ca. 10 cm Papierhandtücher aufgebracht. Eine zweite Glasplatte sowie ein Gewicht zum Beschweren (ca. 500 g) wurden auf den Stapel gelegt. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht. Die Membran wurde 15 min getrocknet, anschließend wurde die DNA auf der Membran bei 0,6 J und 340 nm fixiert.

II.2.7.3 Northern-Blot Analyse von RNA

Denaturierende RNA-Agarosegele wurden für den Kapillartransfer zuerst kurz in Wasser und anschließend zweimal 15 min in 20x SSC geschwenkt. Der Blot wurde wie unter Punkt II.2.7.1 beschrieben aufgebaut, wobei jedoch 20x SSC als Transferpuffer verwendet wurde. Nach einem Transfer von 15-18 h wurde die RNA durch UV-Licht bei 0,6 J auf der trockenen Membran fixiert. Der Filter wurde entweder direkt in der Hybridisierung eingesetzt oder bei 4°C gelagert. Zur Abschätzung der aufgetragenen RNA-Menge wurde der Filter mit Methylenblau gefärbt, mit Wasser gewaschen und zur Dokumentation fotokopiert.

II.2.7.4 Hybridisierung und Chemilumineszenzdetektion

Die Southern und Northern-Blot Analysen erfolgten nach der in Maniatis *et al* (1989) beschriebenen Methoden mit folgenden Modifikationen:

Die über UV-Quervernetzung an die Nylonmembran gekoppelte DNA und RNA wurde in Churchpuffer (7% (w/v) SDS, 50 mM Natriumphosphat, pH 7) eine Stunde bei 68°C prähybridisiert und über Nacht bei 68°C mit Dig-markierten DNA-Sonde (10-12 ng/ml für DNA, 20-25 ng/ml für RNA) hybridisiert. Zum Entfernen der ungebundenen DNA-Sonde wurde die Membran 30 min bei 68°C und danach noch 40 min bei RT in Phosphatpuffer (40 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 1 % (w/v) SDS) gewaschen.

Die Detektion der Dig-markierte DNA-Sonde erfolgte nach Herstellerangaben mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Die Visualisierung Hybridisierungspositiver Banden erfolgte mittels enzymatischer Dephosphorylierung des Chemilumineszenzsubstrats CSPC (Boehringer Mannheim, Deutschland) durch die alkalische Phosphatase, wobei das emittierte Licht zur Schwärzung eines Röntgenfilms (Kodak) führte.

II.2.8 Biochemische Methoden

II.2.8.1 Expression und Aufreinigung von GST-B4-His Fusionsproteinen

Zur Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein wird das B4-Gen in den Vektor pGEX-4T-His der Firma Invitrogen inkloniert. Eine Einzelkolonie mit dem gewünschten pGEX-B4-His Plasmid wurde von einer frischen LB-Platte mit 50 µg / ml Ampicillin in 50 ml LB-Medium unter gleichem Selektionsdruck überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Über-Nacht-Kultur wurde anschließend auf OD₆₀₀ = 0,3 verdünnt und 100 ml der Kultur bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins GST-B4-His wurde durch

Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die induzierten Zellen für 15 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS gewaschen und in 10 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Lösung durch kurze Ultraschallimpulse zu je 10 Sekunden und einer Abkühlung im Eiswasserbad aufgeschlossen, bis die Lösung eine wasserähnliche Viskosität aufwies. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde das Bakterienlysat aus dem Überstand gewonnen.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie, wobei die Bindung des im Fusionsprotein enthaltenen Histidin-Tag an Nickelionen ausgenutzt wird. Je nach aufzureinigender Proteinmenge wurde eine entsprechende Menge Nickel-NTA-Agarose in einer 5 ml Plastiksäule mit Bakterien-Lysat vorbereitet (pro 10^8 Zellen 1 ml Ni^{2+} -NTA). Das Säulenmaterial wurde mehrmals mit H_2O gewaschen. Anschließend wurde von oben eine Fritte auf das Säulenmaterial aufgelegt, um eine gleichmäßige Beladung der Säule zu gewährleisten. Das Säulenmaterial wurde mit Lyse-Puffer äquilibriert und hiernach mit entsprechendem Zell-Lysat beladen. Zur Entfernung nicht gebundener Proteine wurde die Säule jeweils mit dem zehnfachen Säulenvolumen mit Wasch-Puffer gewaschen. Die GST-B4-His Fusionsprotein wurde durch Elution-Puffer schrittweise eluiert. Die Lagerung des eluierten GST-B4-His-Proteins erfolgte bei -80°C .

Lyse-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4	Wasch-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4
	1 M NaCl		1M NaCl
	10 mM Imidazol		10 mM Imidazol
	1 % Triton X-100		
Elution-Puffer:	50 mM NaH_2PO_4		
	1 M NaCl		
	300 mM Imidazol		

II.2.8.2 Herstellung von *T. gondii*- Lysat

Mit Hilfe der Einfrier/Auftaumethode können Zellen mechanisch aufgebrochen werden. Dafür werden $10^9/\text{ml}$ Toxoplasmen in Proteaseinhibitor-cocktail-haltigen Wasser aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sobald die Lösung komplett gefroren war, wurde sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut werden. Dieser Vorgang wird bis 10mal wiederholt. Um große

Membrantrümmer und nicht aufgeschlossene Toxoplasmen abzutrennen, wurde das Lysat einmal bei 4°C für 10 min mit 600 x g zentrifugiert und der Überstand nochmals für 15 min mit 10000 x g bei 4°C zentrifugiert. Dieser Überstand wird im folgenden als TLA bezeichnet.

II.2.8.3 Zellfraktionierungen von *T. gondii*

Die durch Schockgefrieren gewonnen TLA aus Punkt II.2.8.2 wurden durch eine Ultrazentrifugation (100000 x g, 1 Stunden, bei 4°C) in eine „high speed supernatant“ Fraktion (HSS) und in einer „high speed pellet“ Fraktion (HSP) weiter partitioniert. Die HSP Fraktion wurde direkt in 2 x Probenpuffer aufgenommen, die HSS Fraktion wurde mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und ebenfalls in 2 x Probenpuffer aufgenommen.

II.2.8.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) mit dem Bradford- Reagenz der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München durchgeführt. Als Eichprotein diente Rinderserumalbumin. In einer Mikrotiterplatte wurden zunächst serielle Verdünnungen der Zellextrakte in PBS hergestellt (Volumen 20µl, Doppelbestimmungen). Als Standard dienten verschiedene Konzentrationen von BSA in PBS (Dreifachbestimmungen). Nach Zugabe von 200µl Bradford-Reagenz wurde die Absorption bei 595 nm in einem ELISA-Reader (Tecan Rainbow, SLT Labinstrument, Crailsheim) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software EasyWin Fitting (Tecan).

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

Bradford-Stammlösung: 100 mg Comassie Blue G
 +50 ml Ethanol 97%
 +100 ml Phosphosäure 85 %

Die Stammlösung wurde bei 4°C in einer lichtundurchlässigen Flasche aufbewahrt.

Die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) führt zu einer Degradierung der Proteine, so dass enzymatische Aktivitäten häufig verloren gehen. Antigen determinanten bleiben aber zumeist erhalten, so dass diese Methode für das Konzentrieren von Proteinen für Western-Blot-Analysen geeignet ist.

II.2.8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

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

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

Lösung C: 10% (w/v) SDS in H₂O

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

Elektrophoresepuffer: 28,8 g/l Glycin
6 g/l Tris
1 g/l SDS

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

Die Lösungen wurden entgast und in einem Lichtundurchlässigen Flasche bei 4°C lagern.

SDS-Probenpuffer: 2 g SDS
75 ml Lösung D
25 ml 50% Glycin in H₂O
ad libitum Bromphenolblau
(+ 5% β -Mercaptoethanol)

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

Trenngel: 8 ml Lösung A
5 ml Lösung B
0,2 ml Lösung C
6 ml entgaste H₂O.

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

Sammelgel: 10 ml Sammelgellösung
+ 100 µl 10% APS
+ 10 µl TEMED

II.2.8.7 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE Gelen mit Coomassie-Blau

Zum Nachweis der Proteine wurde das Trenngel zwei bis vier Stunden bei RT in Coomassie-Färbung geschwenkt. Danach wurde es mit Wasser abgespült und in Entfärberlösung gelegt. Unter mehrmaligem Wechsel der Entfärberlösung wird das Gel nun 2-4 Stunden bei RT entfärbt und anschließend 30 min in Wasser gewaschen.

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

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

II.2.9 Immunologische Methoden

II.2.9.1 Immunoblotting-Verfahren (Western-Blot)

Protein wurden Zwecke der Immunodetektion nach ihrer Trennung in der SDS-PAGE in einem Semi-Dry-Blot auf Nitrozellulose-Membranen der Porengröße 0,45 µm elektrophoretisch transferiert. Die Blotzeit betrug 30 min. Die transferierten Proteine auf der Membran ließen sich mit Ponceau S reversible färben.

Die Immunodetektion wurde mit dem Enhanced Chemiluminescence (ECL)-System nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

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

II.2.9.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IFA)

Durch die Fixierung von Zellen und anschließender Permeabilisation sowie Inkubation mit Antikörpern gegen ein spezifisches Protein kann die Lokalisierung bzw. Expression desselben sichtbar gemacht werden. Ist an diesen Antikörper nicht direkt ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so muss er durch einen zweiten Antikörper, der solch eine Farbstoff-Kopplung besitzt, erkannt werden (indirekte Immunfluoreszenz). Dies führt gleichzeitig zu einer Verstärkung des Signals. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann der Fluoreszenzfarbstoff durch Licht der richtigen Wellenlänge angeregt und sichtbar gemacht werden. Die Methode wird kurz dargestellt: Die auf Deckgläsern hochgezogene HFF-Kultur, wurde mit *T. gondii* Tachyzoiten infiziert und so lange inkubiert, bis sich Parasitenrosetten in 4 bis 8 Tachyzoit pro Vakuole gebildet hatten. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min fixiert. Nach der Fixierung erfolgt eine Inkubation in 0,1 M Glycin in PBS für 3 min, um den Überschuss an Fixierlösung zu neutralisieren. Die Zellen werden dann mit PBS / 0,2 % Triton-X-100 für 20 min permeabilisiert. Im Anschluss werden unspezifische Protein-Bindungsstellen durch eine 20 minütige Inkubation in Blockierungslösung abgesättigt. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgen auf dem Schüttler. Nachfolgend werden die Zellen für 1 Stunde mit dem Primärantikörper, der zuvor in Blockierungslösung verdünnt wurde, inkubiert. Anschließend wird 3 x 10 min mit Waschlösung gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper, der ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt wurde, inkubiert. Es wurde erneut 3 x 10 min mit Waschlösung gewaschen. Nun folgt die DAPI-Färbung für 5 min der Farbstoff DAPI interkaliert in die DNA und erzeugt bei der Anregung ein blaues Fluoreszenzlicht. Abschließend wurde noch einmal mit PBS gewaschen. Die Deckgläser werden in Fluoromont-GTM auf Objektträgern eingebettet und bei 4° C im Dunkeln aufbewahrt.

Die IFA mit extrazellulärem Parasiten erfolgte wie bei intrazellulär Parasiten. In diesem Fall ist ein zusätzlicher Schritt erforderlich, die die Haftung der Parasiten auf einem Deckglas ermöglicht. Dafür werden aus frisch lysierten Wirtszellen geerntete Parasiten in 500 µl PBS resuspendiert und vor der Fixierung in eine Kulturplatte überführt, die pro Schale ein vorgelegtes Deckglas enthält. Die anschließende Zentrifugation der Kulturplatte bei 2000 x g für 10 min verbessert die Haftung der Parasiten auf dem Deckglas.

II.2.9.3 Direkte Immunfluoreszenzanalyse mit GFP oder YFP

Das grün fluoreszierende Protein, ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert, kann direkt mikroskopiert werden (selbst lebende Zellen können damit mikroskopiert werden). Die Seitenketten der drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin der Positionen 65-67 im GFP Protein sind zu einem Fluorophor zyklisiert. Durch Absorption von Strahlung des blauen Wellenlängenbereiches (Absorptionsmaximum bei 395 nm) wird diese Gruppe zum Leuchten angeregt. Das GFP Protein emittiert dann Licht mit einem Emissionsmaximum von 508 nm. Diese Wellenlänge liegt im grünen Spektralbereich.

In dieser Arbeit wurden B4-GFP und B4-YFP Fusionsprotein in *T. gondii* hergestellt und detektiert. Intrazelluläre Parasiten, die GFP oder YFP exprimieren, wurden wie in Abschnitt II.2.9.2 beschrieben fixiert und danach direkt für IFA eingebettet.

II.2.9.4 Analyse der Bewegungsfähigkeit von Toxoplasmen: “gliding motility” assay

In eine Kulturplatte, die pro Schale ein vorgelegtes Deckglas enthält, wurde 500 µl einer 50% PBS 50% FCS Lösung abgegeben und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Schalen werden zweimal mit PBS gewaschen und mit aufgereinigten Parasiten, die in 500 µl Medium resuspendiert waren, beladen. Nach 30 min Inkubation wurden die Schalen dreimal mit PBS gewaschen und für IFA-Analysen, wie oben beschrieben, verwendet.

II.3 Zellbiologische Arbeitstechniken

II.3.1 Zellkulturen

Alle Kulturen wurden bei 37°C in einem Brutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10% (v/v) CO₂ kultiviert. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilwerkbank unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Zellkulturabfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert. Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden mit 5% bzw. 10% fötalem Kälberserum supplementiert, das vor Verwendung für 30 Minuten auf 56°C erhitzt wurde, um Komplementproteine zu inaktivieren. Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen und Puffer wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, zwei bis drei bar) autoklaviert. Temperaturinstabile Lösungen wurden mit Hilfe einer 0,2 µm Membran (‘Bottle top filter’, Schleicher & Schüll, Dassel) steril filtriert. Glasgeräte wurden für 4 Stunden bei 210°C hitzesterilisiert.

II.3.1.1 Kultivierung von Wirtszellen

Als Wirtszelllinie zur Kultivierung der Parasiten wurden humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) verwendet; nur zur Gewinnung großer Mengen von Parasiten-Material für einzelne Versuche wurden Glioblastomzellen 86HG39 benutzt. Diese wachsen in bis zu vier Zellschichten übereinander und ermöglichen dadurch eine höhere Parasitenproduktion über längere Zeit.

Die HFF-Zellen haben mehrere Vorteile: beim Kontakt mit den Nachbarzellen kommt es zur Hemmung des Zellwachstums, so dass sich eine konfluente, einschichtige Kultur bildet. Die Morphologie der Zellen- große, flache Zellen mit fester Plasmamembran- erlaubt mehrere Zyklen der Parasitenvermehrung bevor es zur Lyse der Wirtszelle kommt. Dadurch erhält man einen hohen Parasitentiter und eine nahezu vollständig lysierte Wirtszellkultur mit sehr geringen Verunreinigungen. Außerdem, HFF-Zellen eignen sich durch ihr Auswachsen als Einzelschicht (monolayer) besonders für sensitive Versuche, wie z.B. IFA sowie Selektion und Klonierung von stabil transfizierten Toxoplasmen.

Die HFF-Zellen oder die Tumorzellen 86HG39 wurden mit oder ohne Infektion in 175 cm² Zellkulturflaschen in Zell-Medium (IMDM, 1% Glutamin, 10% (v/v) FCS, 25 µg/ml GentaMycin) in befeuchteten Brutschrank unter 10% CO₂ kultiviert. Die Zellernte erfolgte nach 3 bis 5 Tagen.

Um Zellen zu „splitten“ oder um sie für Tests in Mikrotiterplatten zu überführen, wurde zunächst das Kulturmedium entfernt. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 bis 10 Minuten mit 5ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, um die adhärenenten Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Nach Zugabe von 8 ml Zell-Medium wurde die erhaltene Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation (1200 rpm, 10min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R) pelletiert. Den in der Kulturlasche verbliebenen Zellen wurde, zur erneuten Vermehrung, 12 ml Zell-Medium zugegeben.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5-10 ml Medium resuspendiert. Dann wurde die Anzahl der lebenden Zellen festgestellt. Dazu wurden 50µl der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung geeignet verdünnt und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde dann auf die geeignete Anzahl Zellen/ml eingestellt und für Zellassays verwendet.

Für die Sicherung der Zelllinien wurden je ca. 10^7 Zellen in 1 ml FCS/10%DMSO aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

II.3.1.2 Expression des B4-Proteins in 86HG39 Tumorzellen

Astrocyten 86HG39 wurden mit der Plasmid pB4-EGFP mittels Elektroporation transfiziert. Für diesen Vorgang wurden ca. 10^7 Zellen benutzt. Nach zwei Waschschritten mit 10 ml PBS wurde das Pellet in 500 μ l PBS resuspendiert und mit 20 μ l DNA vermischt und in eine Elektroporationskuvette (Elektrodenabstand 0,4 cm) überführt und eisgekühlt. Das Elektroporationsgerät wurde auf 250 V/cm Elektrodenabstand und 960 μ F eingestellt, die Kuvette wurde zwischen die Elektroden platziert und der Impuls ausgelöst. Nach dem elektrischen Impuls wurde die Kuvette schnell mit 1 ml vorgewärmten Medium (IMDM) versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension in eine kleine Petrischale überführt, in der 5 ml warmes Kulturmedium vorgelegt waren.

Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und durch Medium und Geneticin (G418 1mg/ml) zur Selektionierung ersetzt. Um die toten Zellen zu entfernen, wurden die Petrischalen alle zwei Tage mit PBS gewaschen und das Selektionsmedium erneuert. Als positive Kontrolle für die Wirkung des G418 wurden nicht transfizierte Zellen verwendet, die keine G418 Resistenz besitzen. Nachdem alle nicht-resistenten Zellen abgestorben waren, nach ca. 2 Wochen, wurden die resistenten Zellen noch ca. 7 Tagen weiter in Medium und G418 1mg/ml inkubiert, bis sich die vereinzelter Zellen zu Kolonien entwickelt haben. Die Zellen wurden dann auf ihre Expressionseigenschaften analysiert.

II.3.2 Toxoplasmen

II.3.2.1 *In vitro* Kultur von *T. gondii*

T. gondii Tachyzoiten der Stammgruppe I (BK und RH sowie deren Derivate) wurden in HFF- oder in 86HG39-Zellen als Wirtszellen kultiviert. Parasiten wurden auf 25 cm² Zellkulturflaschen gegeben, die bereits mit Wirtszellen bewachsen waren. Bei einem Parasit/Wirtzell-Verhältnis von 5:1 wurden alle Wirtszellen zwei bis drei Tage nach Infektion lysiert. Die freigesetzten Parasiten wurden abgespült und bei 50 x g für 5 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der so gewonnene Überstand wurde bei 600 x g für 15 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 600 x g für 10 min, um die Parasiten zu pelletieren. Die Anzahl isolierter

Toxoplasmen wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die komplette Lyse einer konfluenten HFF-Kultur aus einer 25 cm²-Kulturflasche ergibt ca. 5×10^7 bis 1×10^8 Tachyzoiten des RH- oder BK- Stammes. Nach Lyse der Wirtszellen sterben Tachyzoiten innerhalb von 10 Stunden, falls ihnen keine neuen Wirtszellen zur Verfügung stehen. Daher wurden die extrazellulären Parasiten möglichst schnell zur Weiterkultivierung verwendet.

II.3.2.2 Einfrierung von *T. gondii* Tachyzoiten

Für das Einfrieren verwendet man intrazelluläre Parasiten. Dazu werden HFF-Zellen mit Parasiten infiziert. Die Wirtszellen sollten vor dem Einfrieren möglichst viele Toxoplasmen enthalten. Die Trypsinierung erfolgte wie unter II.3.1.1 beschrieben. Den abgelösten Zellen wurden 750 µl Einfriellösung (vorgekühltes IMDM mit 50% FCS und 25 % DMSO) zugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Die Zellen werden in 1,5 ml Einfrierröhrchen überführt und für maximal 24 Stunden bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

II.3.2.3 Auftauen von *T. gondii* Tachyzoiten

Die eingefrorenen Parasiten werden dem Einfrierröhrchen bei 37°C im Wasserbad kurz aufgetaut und der Inhalt in 15 ml Röhrchen überführt, in dem schon 5 ml kaltes Medium vorgelegt waren. Nach einer Zentrifugation bei RT für 10 min 1500 x g wurde das Pellet in 10 ml frisch Medium resuspendiert und hiermit konfluente HFF-Zellen infiziert.

II.3.3 DNA-Transfer in *T. gondii* Tachyzoiten

Für die Transfektion oder Klonierung werden reine Tachyzoiten-Präparationen benötigt. Dazu wurden Suspensionen von Toxoplasma-infizierten Zellen dreimal mit einer 10 ml-Spitze durch eine Kanüle der Größe 27 gezogen. Die Scherkräfte, die dabei entstehen, brechen die eventuell noch vorhandenen intakten Wirtszellen auf und setzen die viel kleineren intrazellulären Tachyzoiten frei. Die Tachyzoiten sind ca. 6 µm lang und ca. 2 µm im Durchmesser und können dementsprechend mittels Filtration durch einen Polycarbonat-Filter (3 µm Porendurchmesser, Nucleopore) als Einzellsuspension gewonnen werden. Aggregierte Parasiten und Zelltrümmer bleiben im Filter zurück.

II.3.3.1 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion wurde wie von Soldati und Boothroyd beschrieben durchgeführt (Soldati and Boothroyd, 1993). Bei dieser Methode verbleibt die DNA extrachromosomal und geht nach einziger Zeit verloren, da die hier verwendeten Plasmide keinen Replikationsursprung für eine autonome Vermehrung in *T. gondii* besitzen. Die so transfizierten Gene oder Genkonstrukte werden nur begrenzte Zeit (ca. 1 Woche) exprimiert. Frisch geerntete, aufgereinigte, extrazelluläre Parasiten werden für 10 min bei 600 x g abzentrifugiert. Die sedimentierten Parasiten werden in 5 ml Cytomix Puffer (Van den Hoff *et al.*, 1992) resuspendiert und erneut für 10 min bei 600 x g in der Zellkulturzentrifuge sedimentiert. Das Parasitensediment wird in mit 2 mM ATP und 5 mM Glutathion komplementiertem Cytomix aufgenommen, so dass 5×10^7 Parasiten pro ml vorliegen. Darauf werden 60 bis 100 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA hinzugefügt. Das Gemisch wird in eine Elektroporationskuvette (Biorad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2000 V bei 25 Ω und 25 µF im Electro Cell Manipulator Genepulser II. Transfizierte Parasiten wurden nach 15 min Inkubation bei RT auf HFF-Zellen inokuliert.

II.3.3.2 Stabile Transfektion

Um ein funktionstüchtiges, stabil transfiziertes Zellsystem zu erhalten, ist es nötig einen geeigneten Vektor zu finden. Das Plasmid muss im Genom der Zelle integriert sein, damit es an Tochterzellen weitervererbt werden kann. Um Reinkulturen zu erzielen ist ein Antibiotikumresistenzgen nötig. Mit dem entsprechenden Antibiotikum werden die transfizierten Zellen selektiert.

Für stabile Transfektion wird das gleiche Protokoll wie für eine transiente Transfektion verwendet, jedoch zur Erhöhung des Einbaus von Fremd-DNA in das Genom werden die verwendeten Plasmide vor der Transfektion mit einem Restriktionsenzym linearisiert. Dem Elektroporationsansatz wird ferner dasselbe Restriktionsenzyme zugegeben. 24 Stunden nach der Transfektion werden die Parasiten in Selektionsmedium mit 20 µM Chloramphenicol inkubiert (Kim *et al.*, 1993). Diese Antibiotikumkonzentration ist für die Selektion der transfezierten Parasiten ausreichend und zeigt nur minimale toxische Effekte auf die HFF-Zellen (Kim *et al.*, 1993). Die Parasiten gehen durch 20-25 Teilungen (etwa 7-8 Tage), bevor die Selektion wirksam wird. Ab diesem Zeitpunkt sterben sukzessive alle diejenigen Parasiten ab, welche den Selektionsvektor nicht funktionell in ihr Genom integriert haben.

II.3.3.3 Klonierung von *T. gondii*

Um aus einer polyklonalen Population an transfizierten Parasiten nach Selektion Parasiten mit definiertem Genotyp zu gewinnen, ist es nötig, diese zu klonieren. Im Falle von *T. gondii* erreicht man dies durch Verdünnungsreihen auf einer mit Wirtszellen beschichteten Mikrotiterplatte, in dem man mit einer definierten Anzahl an Parasiten startet und diese so weit verdünnt, bis nur noch ein Parasit in einem Napf der Mikrotiterplatte vorhanden ist. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit HFF-Zellen beschichtet. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und gegen 100 µl IMDM/ 10 % FCS/ 20 µM Chloramphenicol pro Napf ersetzt. Die zu klonierenden Parasiten wurden mit dem Zellrasen abgeschabt und durch Kanülen gepresst, um die Wirtszellen zu zerstören und die Toxoplasmen aus diesen zu befreien. Die Anzahl der Parasiten wurde in einer Neubauer Zähnkammer bestimmt und die Anzahl der Parasiten auf 10/ml mit dem für die Passage der Parasiten verwendeten Medium eingestellt. Mit einer Multipipette wurden je 100 µl dieser Parasitensuspension aufgenommen und in die erste Reihe Näpfe der Mikrotiterplatte pipettiert. Der Inhalt der Pipette wurde vorsichtig mit dem Medium in der Mikrotiterplatte vermischt und daraus 100 µl in die nächste Reihe pipettiert. Die letzten 100 µl jeder Verdünnungsreihe wurden verworfen. Die 96er Mikrotiterplatten dürfen für die nächsten 6-8 Tage nicht bewegt werden, bis einzelne Parasitenklone als Plaques im Mikroskop erkennbar sind. Nur die Parasiten aus einzelnen Plaques werden geerntet und in eine 24-Lochplatte unter Chloramphenicolgabe weiter kultiviert.

II.3.4 Toxoplasmen Proliferationstest

Das Prinzip der Messung der intrazellulären Proliferation von *T. gondii* beruht auf den Beobachtungen von Pfefferkorn und Pfefferkorn 1977 die zeigten, dass radioaktives ³H-Uracil von Toxoplasmen sehr gut eingebaut wird. Dies ist auf die Aktivität der Uracil-Phosphoribosyl-Transferase zurückzuführen, die in Toxoplasmen 100-fach höher ist als die in den Wirtszellen (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977). Aus dieser Erkenntnis wurde dann 1979 von McLeod und Remington die Methode zur Messung der intrazellulären Proliferation von Toxoplasmen entwickelt.

Zur Quantifizierung der Proliferation wurden 3×10^4 Tumorzellen 86HG39 in 96-well Zellkulturplatten kultiviert und mit 3×10^4 , 1×10^4 , $0,3 \times 10^4$ und $0,1 \times 10^4$ Toxoplasmen infiziert. Nach 1 bis 5 Tage Inkubation wurde jeweils ein Ansatz mit 37 kBq/well ³H-Uracil markiert.

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde der Testansatz bei -20°C eingefroren. Dabei werden die Zellmembranen zerstört und die Nukleinsäuren freigesetzt. Für die Messung des inkorporierten ^3H -Uracils wurden die Testkulturen aufgetaut und mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) übertragen. Die Filter wurden 10 min bei 100°C in einem Trockenschrank getrocknet und anschließend, nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac), einzeln in Plastikfolie eingeschweißt. Die Auswertung der Analysen erfolgte in einem Beta-Counter. Hierbei wird die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung gemessen und in *counts per minute* (cpm) berechnet. Die Summe der pro Ansatz errechneten cpm gilt als Maß für die Stärke der Proliferation der Toxoplasmen.

Für die Proliferationstest mit stabil transfizierten EGFP und B4-EGFP humanen Tumorzellen wurde das gleiche Protokoll wie bei Toxoplasma Proliferationstest verwendet, jedoch statt ^3H -Uracil wurde das radioaktive Thymidin benutzt.

II.3.5 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.3.6 FACS Analyse

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische

Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörpern/Zelle.

Da die Parasiten RH-B4-YFP und RH-YFP-YFP das fluoreszierte YFP Protein direkt im Zytoplasma exprimieren, benötigt man keine Antikörper für die FACS-Analyse.

Für die FACS-Analyse mit extrazellulär Parasiten wurden je 2×10^6 RH-YFP-YFP oder RH-B4-YFP Parasiten nach der Ernte zwei mal mit PBS gewaschen und für 20 min in 4 % Paraformaldehyd/ PBS abgetötet. Die Parasiten wurden danach abzentrifugiert und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Kurz vor der Messung wurden die Parasiten auf einem Vortexmischer bei niedriger Geschwindigkeit gründlich gemischt, um für die FACS-Messung die Einzelzellen zu erhalten. Als Negativkontrolle wurden native Parasiten des Stamms RH verwendet.

Zum einfachen und schnellen Nachweis der Invasionseffizienz der Parasiten wurde ein Invasion-Assay durchgeführt. Dafür wurden Kulturen mit HFF mit RH-B4-YFP und RH-YFP-YFP Toxoplasmen, in einem Parasit/ Wirtzelle Verhältnis von 50/1, inokuliert. Nach eine Stunde Inkubation wurde die extrazelluläre Toxoplasmen dreimal mit PBS abgewaschen. Die Zellen werden danach für 20 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert, trypsinisiert und in 1ml FACS-Puffer resuspendiert und mit FACS-Gerät (FACS-Calibur, Becton-Dickinson) analysiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen analysiert die mit nativen RH Toxoplasmen inokuliert wurden.

Zur Quantifizierung exprimierter EGFP und B4-EGFP Proteine bei stabile transfizierten humanen 86HG39 Zellen wurden 2×10^6 Zellen nach 48 Stunden Inkubation im IMDM-Medium trypsinisiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1ml FACS-Puffer resuspendiert und mit FACS-Gerät analysiert.

Bei allen FACS-Analysen wird zunächst immer mit der Negativkontrolle die Voreinstellung des Gerätes vorgenommen. Es wird eine Populationswolke festgelegt, in der die Messung erfolgt und Partikel kleinerer Größe ausgeschlossen sind. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgt mit dem Programm Cell Quest der Firma Becton Dickinson.

II.4 Computergestützte Auswertungsprogramme

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem DNASTar Programmpaket analysiert (DNA Star, Madison, USA). Mit Hilfedes Clone Manager 5.0 (Scientific and Educational Software) wurden Plasmidkarten erstellt. Für die Sequenzanalysen und Datenbankvergleiche auf Nukleinsäure- sowie Aminosäure-Ebene wurde das BLAST-Search Programme des NCBI (national center for biotechnology information) eingesetzt, welche durch die Homepage des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zugänglich ist. Weiterhin fanden die online Datenbanken des „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL, Heidelberg) sowie „Swiss-Prot“ Verwendung. Das Auffinden bestimmter Motive in den Sequenzen erfolgte durch Vergleiche mit bekannten Proteinmotivmustern in der Prosite-Datenbank (ExPasy Molecular Biology Server, Swiss Institute of Bioinformation). Für die Untersuchung von Aminosäuresequenzen auf die Fähigkeit zur Ausbildung von „coiled-coil“ Strukturen kamen die Programme „coils“ nach der Lupas Methode, „paircoil“ nach der Methode von Berger und „multicoil“ zum Einsatz. Alle drei Programme sind wiederum unter www.expasy.ch verfügbar.

III. Ergebnisse

Wie bereits erwähnt, wurde von unserer Arbeitsgruppe eine cDNA-Expressionsbank des Tachyzoitenstadiums von *T. gondii* in dem Bakteriophage lamda Vektor „λExCell“ konstruiert (Nockeman, 1998). Das Screening mit humanen Antiseren führte zur Isolierung von drei unbekannten Genen, deren Expressionsprodukte eine sehr starke Reaktivität mit den humanen Antikörpern zeigten: H4, B10 und B4.

Während H4 als MIC5-Protein erkannt wurde (Brydges *et al.*, 2000) und B10 als ein neues „dense granula“-Protein identifiziert wurde (Adjogble *et al.*, 2004), bleibt B4 ein unbekanntes Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das B4-Antigen näher charakterisiert.

Zunächst stand die vollständige cDNA-Sequenz von dem B4-Gen, die von Frau Nockemann 1998 in der EMBL Datenbank unter Acc. No. Y10033 veröffentlicht wurde, zur Verfügung. Das längste offene Leseraster beginnt nach einem vorgeschalteten Stopcodon (Position 92) mit dem ATG-Startcodon in Position 275 und weist um den Translationsstart eine Sequenz (CAGATGGAA) mit großer Identität zu der Toxoplasma „Kozak“-Konsensus-Sequenz auf (Seeber, 1997). Übereinstimmungen mit der „Kozak“-Konsensus-Sequenz sind A in Position -2, sowie G in den Positionen -1 „upstream“ des Startcodons. Ein TGA-Stopcodon in der Position 769 führt zum Abbruch der Proteinsynthese und wird gefolgt von einer 495 bp langen Sequenz in dem 3'-UTR. Es handelt sich also um ein Gen ohne Introns, das aus einem einzigen codierenden Exon besteht. Zur weiteren Untersuchung der B4 Sequenz konnte Frau Nockemann ein SacI-Fragment aus dem *T. gondii* Genom klonieren und sequenzieren. Dabei zeigte sich, dass das gewählte SacI-Fragment offensichtlich das B4-Gen enthält. Zusammen mit dem Vergleich der B4 cDNA-Sequenz mit den aktualisierten, neuen Daten des *T. gondii* Genomprojektes kann man sich die genomische Organisation des B4-Gens wie Abbildung 7 zeigt, vorstellen.

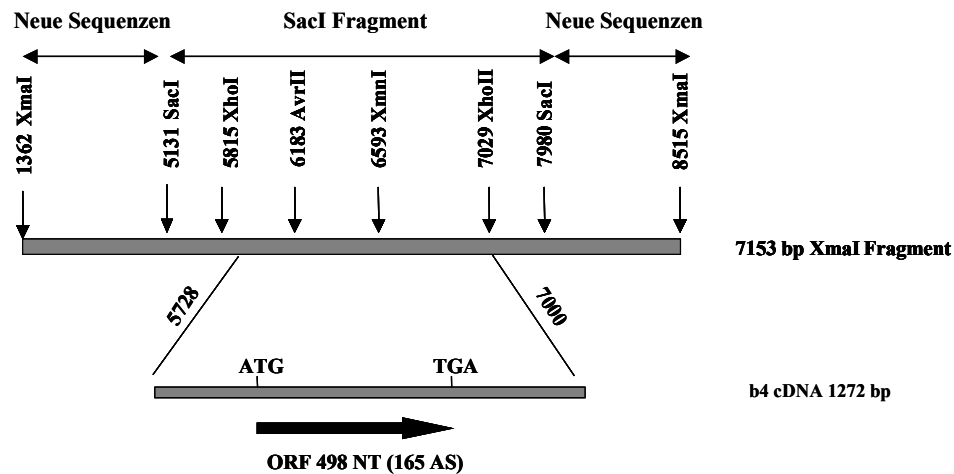


Abbildung 7 : Schematische Darstellung der Organisation des B4-Gens

Die obere Linie repräsentiert eine 7,15 kb langen genomischen XmaI Fragmente mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen. Darunter ist schematisch die Größe der B4-cDNA dargestellt. Der dicke Pfeil stellt den offenen Leserahmen dar.

Damit sind Heute zusätzlich zu dem vorher bekannten SacI-Fragment 3769 weitere Basenpaaren des 5' flankierenden Bereiches und 535 bp des 3' flankierenden Bereiches identifiziert. Diese Datenbankangaben wurden durch eigene Klonierungen und Sequenzierungen bestätigt.

III.1 Analyse des B4-Gens

Der offene Leserahmen des B4-Gens kodiert für ein Protein bestehend aus 165 Aminosäuren. Aus dieser Aminosäuresequenz errechnet sich eine molekulare Masse von 19 kDa. Für die Suche nach verwandten Sequenzen des B4-Proteins wurde das Programm BLAST in verschiedenen Versionen verwendet (Altschul *et al.*, 1997; Altschul and Koonin, 1998; Schaffer *et al.*, 2001; Altschul *et al.*, 1990). Ebenso wie bei den Analysen aus dem Jahr 1998 konnten auch in 2005 keine Proteine bzw. Gene gefunden werden, die eine signifikante Homologie zu dem B4-Protein oder zu seiner DNA-Sequenz aufweisen. Es konnte auch keine bekannte funktionelle Domäne identifiziert werden, was darauf hinweist, dass es sich bei B4 um ein bislang noch nicht beschriebenes Protein handelt. Die neue Analyse von Daten des EST-Sequenzierprojektes (*Expressed Sequence Tag*) (Ajioka *et al.*, 1998) führte zur Erkennung von zwei ESTs (TgESTzyh40f08.y1, GenBank accession number CB382243 bzw. TgESTzyc70c05.y2, GenBank

accession number CB026827), deren Sequenzen Ähnlichkeiten mit B4-Sequenz zeigten. Leider liegen zu diesen EST-Sequenzen keine weiteren Angaben in der Literatur bzw. in den Datenbanken vor, so dass sich auch hier keinerlei Hinweise auf die mögliche B4-Funktion ergeben.

Mittels der Gen-Datenbank <http://www.toxodb.org> konnte das B4-Gen jetzt auf dem Chromosom X in der Nähe des inneren Membran-Komplex (IMC2) Gens lokalisiert werden. Das IMC2-Gen kodiert für ein zytoskelettales Protein, das direkt unter der Plasmamembran des Parasiten liegt (Mann and Beckers, 2001). Auf dem Chromosom X befinden sich noch drei weitere Gene, die für zytoskelettale Proteine kodieren: das Myosin A (MyoA), das „gliding associated protein“ (GAP45) und das Toxofilin Gen (MyoA). Unter der Plasmamembran des Parasiten wurde das Myosin A-Protein in Verbindungen mit dem IMC-Protein nachgewiesen, wodurch es eine ideale Position hat, um eine Funktion als Motor im Modell der gleitenden Bewegung zu erfüllen (Hettman *et al.*, 2000). Zusätzlich befinden sich auf dem X Chromosom Gene, die für GRA2, GRA3 und GRA6 kodieren. Dabei handelt es sich um sekretorische Proteine die für die Funktion der parasitophoren Vakuole von Bedeutung sind. Abbildung 8 zeigt schematisch die chromosomale Lokalisation des B4-Gens.

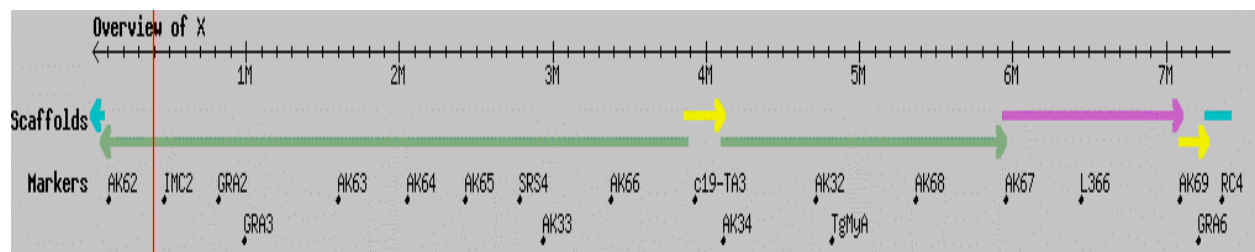


Abbildung 8: die chromosomale Lokalisation des B4-Gens

Die Abbildung zeigt schematisch die Lokalisation des B4-Gens auf Chromosom X. Die genaue Lokalisation ist mit dem roten Strich gekennzeichnet. Die Lokalisation wurde mittels der Gen-Datenbank <http://www.toxodb.org> festgestellt.

III.2 Nachweis der Kopienzahl des B4-Gens im Genom durch Southern-Blot-Analyse

Die bisher vorliegenden Southern-Blot Daten von Nockemann weisen darauf hin, dass das B4-Gen im Toxoplasmenom als „single copy“ Gen vorliegt. Dazu wurden sieben verschiedene, einzelne Restriktionsenzyme eingesetzt. Um diesen Befund weiter abzusichern wurde erneut eine Southern-Blot-Analyse mit einer spezifischen B4-Sonde durchgeführt. Dafür wurde die

genomische DNA von *Toxoplasma* Tachyzoiten isoliert und mit zusätzlichen Restriktionsenzymen bzw. Kombinationen verschiedener Restriktionsenzyme über Nacht verdaut. Die verdaute DNA wurde auf einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt. Nach Denaturierung, sowie Neutralisierung wurde die DNA durch einen Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert. Es folgte die Hybridisierung mit einer B4-spezifischen DIG-dUTP-markierten Sonde. Die Abbildung 9 veranschaulicht, wie die Sonde mit den restringierten DNA-Fragmenten hybridisiert. Es wurde in jedem Restriktionsansatz nur eine sichtbare Bande gefunden. Da das Genom bei *T. gondii* Tachyzoiten haploid ist, kann man aus den von Nockemann bekannten und den hier gezeigten Daten schließen, dass es sich bei B4 um ein „single copy“ Gen handelt.

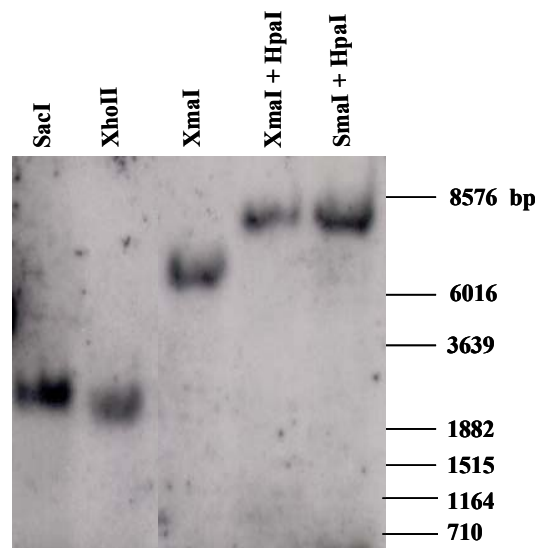


Abbildung 9: Southern-Blot-Analyse des B4-Gens

Die Abbildung zeigt eine Darstellung des Southern-Blots mit der *T. gondii* Digoxigenin-markierte B4-Sonde. 10 µg genomische DNA von BK Tachyzoiten wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und auf ein Agarose-Gel geladen. Rechts daneben befindet sich der Größenstandard.

III. 3 Nachweis der B4-mRNA

In Northern-Blot-Analysen konnte Frau Nockemann unter Verwendung von gesamt RNA aus BK Toxoplasmen die B4-mRNA nur in geringen Mengen nachweisen. Um die Menge an B4-mRNA in *Toxoplasma* Tachyzoiten genauer zu erfassen, wurde daher eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt.

III.3.1 Semi-Quantitative RT-PCR

Um die B4-mRNA quantitativ nachzuweisen wurde Toxoplasmen mRNA, wie in II.2.2.7 beschrieben, aus RH-Parasiten gewonnen. Nach DNase Behandlung zur Vermeidung von kontaminierender genomischer DNA in den Proben wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Um eine quantitative Analyse der Bandenintensitäten zu ermöglichen, wurden jeweils vier Verdünnungsstufen von 1/1, 1/10, 1/100 und 1/200 der cDNA-Proben in der PCR-Reaktion eingesetzt und nebeneinander auf einem 0,8% Agarse-Gel analysiert. Mit der in Abbildung 10 gezeigten semiquantitativen RT-PCR wurde die Transkription der B4-, sag1 und β -Tubulin-mRNA mit ihren spezifischen Primern vergleichend untersucht. Die sequenzspezifischen Oligonukleotidpaare sind für jedes Gen angegeben (siehe II.1.3.1). Der Abgleich der Ergebnisse zeigt, dass das B4-Gen nicht so stark wie die beiden positiven Kontrollen transkribiert wird. Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem amplifzierten Produkt um das B4-Transkript handelte, wurde dieses durch Sequenzierung und Hybridisierung mit der B4-Sonde verifiziert.

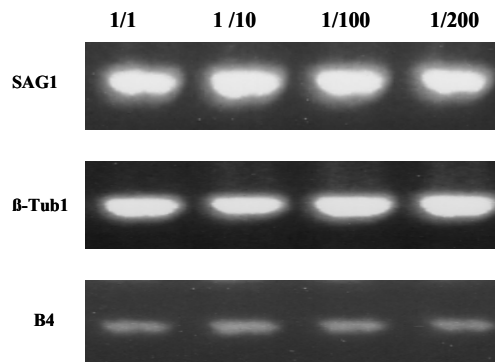


Abbildung 10: Semiquantitative RT-PCR

Die Abbildung zeigt die semiquantitative RT-PCR der Transkripte von B4, SAG1 und β -Tubulin 1. Die cDNA von Tachyzoiten wurde in vier unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (1/1, 1/10, 1/100 und 1/200) und in der PCR eingesetzt.

Zusätzlich wurde die B4-mRNA auch noch mittels Northern-Blot aus gereinigter mRNA aus RH Tachyzoiten nachgewiesen. Zuerst wurde die mRNA aus frisch lysierten Tachyzoiten des RH-Stammes präpariert und auf ein 1%iges Formaldehyd-Agarose-Gel geladen. Die mRNA wurde nach dem Gellauf auf eine Nylonmembran transferiert und mit der gleichen Dig-markierten B4-Sonde wie bei dem Southern-Blot hybridisiert. Es wurde eine einzelne Bande mit einer Größe von ca. 1,2 kb detektiert (Abbildung 11). Diese mit RH Toxoplasmen ermittelte B4-mRNA

Größe ist identisch mit den Daten, die Frau Nockemann mit gesamt RNA aus BK Toxoplasmen erhalten hat.

Bei dem Northern-Blot-Hybridisierungsexperiment konnte weiterhin keine Kreuzhybridisierung mit RNA der Wirtszellen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass es sich bei dem B4-Gen um ein nur für *T. gondii* spezifisches Gen handelt.

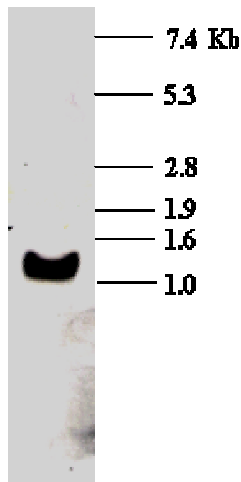


Abbildung 11: Nachweis B4-spezifischer mRNA

60 µg mRNA aus *T. gondii* Tachyzoiten wurden im Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen und mit der B4-spezifischen digoxigenin-markierten Sonde wie beim Southern-Blot hybridisiert. Zum Größenvergleich wurde ein RNA-Standard der Firma Boehringer verwendet.

III.4 Analyse der B4-Aminosäuresequenz

Wie bereits in Kapitel III.1 beschrieben konnten durch Homologievergleiche der B4-DNA keine neuen Erkenntnisse über eine mögliche Funktion des B4-Proteins erhalten werden. Daher wurde die B4 Proteinsequenz im folgenden weiter im Detail untersucht.

Für Proteinanalysen ist Swiss-Prot eine der umfangreichsten im Internet zugänglichen Datenbanken (<http://www.expasy.ch>). Dort sind Daten von über 80.000 Proteinen prokaryotischer und eukaryotischer Organismen gesammelt und ständig aktualisiert. Sie umfassen Informationen zu Aminosäuresequenzen, bekannt gewordenen Modifizierungen und Funktionen.

Anhand dieser Datenbankanalyse wurde zuerst die grobe Struktur des B4-Proteins untersucht. Dabei gab es im Vergleich zu den vorhandenen B4-Proteindaten zunächst keine neuen Erkenntnisse. Die vorhergesagte Sekundärstruktur für B4 ergibt, dass das Protein eine starke Präferenz für α -helicale Bereiche aufweist, β -Faltblattstrukturen treten dagegen fast gar nicht auf. Der Hydrophilitäts-Blot (Kyte and Doolittle, 1982) macht deutlich, dass das B4-Protein

wahrscheinlich sehr hydrophil ist und nur kurze hydrophobe Bereiche auftreten. Die Sequenzanalyse ergab für das B4-Protein keinen Hinweis auf eine Transmembran-Domäne oder ein subzelluläres Lokalisationssignal. Ferner identifiziert das Programm SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) kein Signalpeptid am N-terminalen Ende der B4-Sequenz, so dass es sich bei B4 wahrscheinlich nicht um ein sekretorisches Protein handelt.

Die Bestimmung des theoretischen isoelektrischen Punktes mit verschiedenen Programmen (ProtParam, Compute pI/Mw) ergab einen pI von 9,63, deshalb wird das B4-Protein bei physiologischen pH-Werten mehrfach positiv geladen vorliegen.

Mit Hilfe des NetPhos 2.0-Programmes zur Sequenzanalyse des B4-Proteins (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) bezüglich der Wahrscheinlichkeit möglicher Phosphorylierungsstellen wurden beim B4-Protein acht Serin-, elf Threonin- und eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle postuliert (Abbildung 12). Welche von diesen Phosphorylierungsstellen tatsächlich zur Modifikation des B4-Proteins genutzt werden, ist nicht geklärt.

Weiterhin ergab eine Analyse der B4-Proteinsequenz mittels des Scan-Prosites-Programms (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>), dass das B4-Protein Konsensus-Sequenzen für verschiedene Kinasen aufweist: 2x cAMP- abhängige Proteinkinase, 5x PKC-Protein Kinase C und 2x CK2-Casein Kinase II Phosphorylierungsstellen. Zur Phosphorylierung des B4-Proteins in vivo liegen keine Daten vor.

Zusätzlich zeigt dasselbe Programm (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>), dass das B4-Protein ein Motiv zwischen den Aminosäuren 70 und 86 für ein „nuclear targeting“ enthält. Nach Robbins (Robbins *et al.*, 1991) besteht ein solches Signal aus zwei basischen Aminosäuren, gefolgt von zehn Spacer-AS und mindestens drei weiteren basischen Aminosäuren innerhalb der folgenden fünf Reste (RRrlgdvrvkvkeKDDRR).

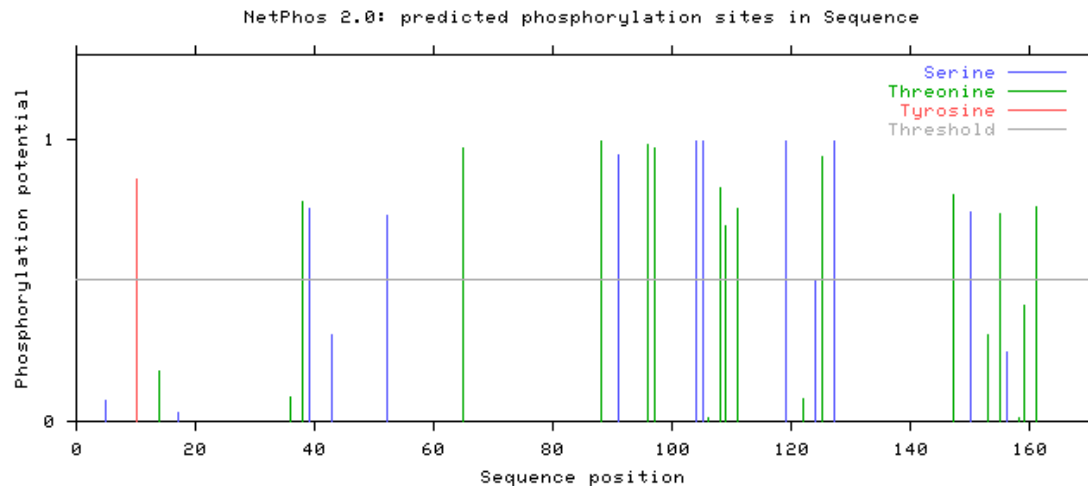


Abbildung 12 : Ergebnisse der Datenbankanalyse für das B4-Protein.

Die Datenbankanalyse mit Hilfe der NetPhos 2.0 hat für B4 insgesamt 22 potentielle Phosphorylierungsstellen ergeben. B4 besitzt 8 mögliche Serin (Ser-) Phosphorylierungsstellen (blau), außerdem 12 mögliche Threonin (Thr-) Phosphorylierungsstellen (grün), sowie eine wahrscheinliche Tyrosin (Tyr-) Phosphorylierungsstelle (rot).

Die Analyse des B4-Proteins auf potentielle „coiled-coil“-Domänen mittels des COILS Algorithmus (Berger *et al.*, 1995) ergab weitere neue Daten. Hierbei wurde eine „coiled-coil“-Struktur zwischen den Aminosäuren 42 und 73 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,9 identifiziert (Abbildung 13). Diese Strukturvoraussage wurde allerdings nur aufgrund der Primärsequenz des B4-Proteins getroffen und ist nicht durch experimentelle Daten unterstützt.

Unter „coiled-coil“ Strukturen versteht man Konformationen, bei denen sich typischerweise zwei bis fünf rechtsgängige α -Helices umeinander winden, um eine linksgängige, superspiralisierte Helix auszubilden. Für gewöhnlich sind die α -helikalen Untereinheiten identisch und verlaufen parallel, das heißt, bezüglich des N- und des C-Terminus sind sie gleichförmig ausgerichtet. Es gibt aber auch „coiled-coil“ Strukturen, deren α -Helices antiparallel verlaufen und es treten darüber hinaus auch „coiled-coil“-Strukturen aus nicht identischen Untereinheiten auf.

Man findet „coiled-coil“-Domänen sowohl in Intermediär-Filamenten, wo sie für die Ausbildung stabiler Proteinnetzwerke verantwortlich sind als auch bei vielen Transkriptionsfaktoren. Ferner ist bekannt, dass „coiled-coil“ Proteine zu Oligomerisierungen neigen.

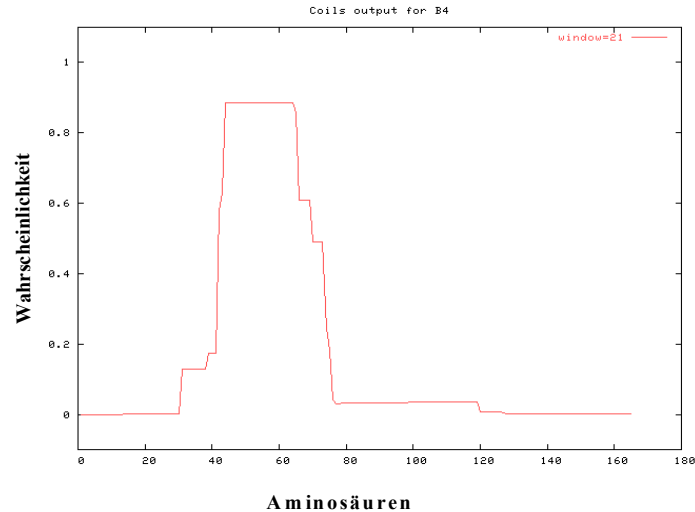


Abbildung 13: Das B4-Protein verfügt über Präferenzen zur Ausbildung von „coiled-coil“

Gezeigt ist die Wahrscheinlichkeit (Y-Achse) mit der die 165 AS (X-Achse) der B4 Proteinsequenz zur Ausbildung von „coiled-coil“ Strukturen neigt. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm COILS Algorithmus 21. Die Wahrscheinlichkeit für „coiled-coil“ Region, die auf der y-Achse angegeben ist, liegt zwischen 0,8 und 1.

Computerunterstützte Protein-Datenbank-Durchsuchungen mit dem „BLAST“-Programm (Altschul *et al.*, 1997) zeigen nur niedrige Homologien der superspiralisierten Domänen des B4 zu bekannten Proteinen auf. Die größte Ähnlichkeit (48%) besteht zur Tropomyosin alpha- 4-Kette des Menschen, Pferd, Schwein und Maus. Die Helical-Wheel-Projektion der 32 Aminosäuren innerhalb der vorhergesagten „coiled coil“ Struktur zeigt, dass die „coiled-coil“-Domäne eine amphiphile Helix formieren kann (Abbildung 14). An den Übergängen zwischen hydrophober und hydrophiler Hälfte taucht jeweils eine geladene Aminosäure auf.

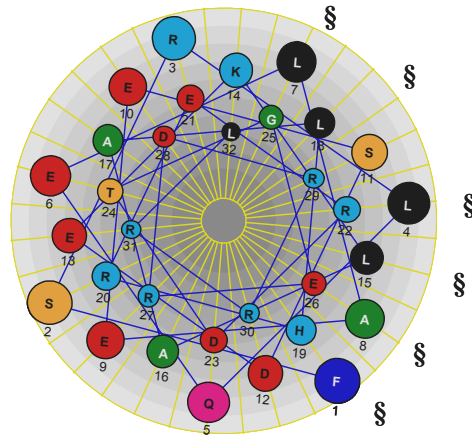


Abbildung 14: Projektion der Helikal-Domäne von B4 in die Ebene.

Die Kreise stellen die (mittels des Einbuchstaben-Codes markierten) Aminosäuren dar. Die blauen Linien zeigen schematisch die Peptidbindungen zwischen den aufeinanderfolgenden Aminosäuren. Die Zahlen bezeichnen die Position der Aminosäure in der B4 „coiled-coil“-Domäne. Die hydrophobe Seite der Helix ist durch das §-Zeichen markiert.

Zusammenfassend ergeben die Daten der Proteinanalyse, dass das B4-Protein wahrscheinlich nicht sezerniert wird und auch nicht auf der Parasitenoberfläche verankert ist. Der Nachweis der „coiled coil“-Struktur lässt vermuten, dass das B4-Protein entweder bei Protein-Protein-Interaktionen im Zytoplasma eine Rolle spielt oder auf Grund seiner „nuclear Targeting“-Region Funktionen im Bereich des Zellkerns übernehmen könnte.

III.5 Nachweis und Lokalisation des B4-Proteins in *T. gondii*

Das nächste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dass B4-Protein in Toxoplasmen nachzuweisen. Dazu musste zunächst ein spezifischer Antikörper gegen das B4-Protein hergestellt werden. Bei der Analyse der Proteinsequenz des B4-Proteins ergab sich, dass eine immundominante Region mit der Sequenz HRERDTGERDRRL (AS 60-70) am C-terminalen Bereich der „coiled coil“-Region vorliegt. Diese Domäne zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen und erschien deshalb als sinnvolles Antigen zur Produktion eines spezifischen Antiserums. Für die Immunisierung wurde das Peptid an KLH als Träger gekoppelt, da nur durch ein ausreichend großes Protein eine Immunantwort hervorgerufen werden kann. Die Immunisierung der Kaninchen und die Gewinnung der Antiseren wurde der Firma Eurogentec übertragen. Während

die Immunisierungsphase verlief, wurde zur Charakterisierung des Antiserums rekombinantes B4-Protein in *E. coli* hergestellt.

III.5.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem B4-Protein

Die vollständige Sequenz der kodierenden Region des B4-Gens wurde mit den Primern EcoRI-B4 und B4-XhoI amplifiziert und in den pGEX-4T-His-Vektor inkloniert. Der verwendete Überexpressionsvektor bietet viele Vorteile. Zum einen wird die Transkription durch einen starken *tac*-Promotor gesteuert, zum anderen wird die Reinigung des rekombinanten B4-Proteins durch die Fusion mit GST am N-Terminus und mit 6 Histidinresten am C-Terminus erleichtert. Nach einem positiven Ergebnis der DNA-Sequenzierung wurde der *E.coli*-Expressionsstamm BL21 mit dem rekombinanten Vektor transformiert und die Bakterien in ampicillinhaltigem LB-Medium exprimiert. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer relativen Absorption bei 600 nm von 0,6 OD kultiviert. Nach der Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Bakterienzellen geerntet und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Das darin enthaltene Protein wurde denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dabei war im Vergleich zu nicht induzierte Kontrolle eine deutliche Proteinbande bei etwa 54 kDa erkennbar. Der Histidin-Tag am C-Terminus des fusionierten GST-B4-Proteins erlaubte die Elution mittels Imidazol aus der Nickel-Agarose. Die Qualität des aufgereinigten Proteins wurde im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel überprüft (Abbildung 15). Das B4-Protein hat mit dem N-Terminalen Glutathion-S-Transferase Fusionsanteil von 27 kDa ein gesamtes Molekulargewicht von etwa 54 kDa. Das theoretische Molekulargewicht des B4-Proteins wurde wie bereits erwähnt nur mit 19 kDa angegeben. Wie später gezeigt wird, besitzt das B4-Protein in der SDS-Gelelektrophorese ein apparentes Molekulargewicht von 27 kDa. Die Diskrepanz zwischen errechnetem und in der Elektrophorese auftretendem Molekulargewicht wird möglicherweise durch die hohe Anzahl von geladenen Aminosäuren des B4-Proteins (32% negativ geladene AS und 41% positiv geladene AS) verursacht (Gaskins *et al.*, 2004). Die geladenen sauren und basischen Aminosäuren liegen nicht in einem Block vor, sondern treten über das gesamte Protein gleichmäßig verteilt auf. Darüber hinaus beinhaltet die Proteinsequenz des B4-Proteins wie bereits erwähnt eine „coiled-coil“-Struktur. In der Literatur wird berichtet, dass viele „coiled-coil“-Proteine wie Dynein und Tropomyosin eine ähnliche Abweichung zwischen errechnetem und apparenten Molekulargewicht zeigen (Dilbeck *et al.*, 1999).

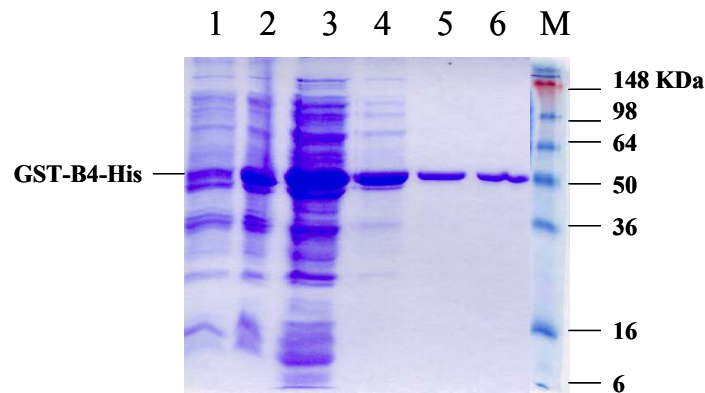


Abbildung 15 : Überproduktion der GST-B4-His Fusionsproteins in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3).

Gezeigt ist das Ergebnis der Aufreinigung des rekombinanten GST-B4-His Fusionsproteins über eine Nickelsäule. Das Bakterienlysat vor Induktion (Spur1), nach Induktion mit IPTG (Spur2), Waschschritt (Spur 3-4) und das aufgereinigte Protein (Spur 5-6) wurden gelelektrophoretisch in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und mit Comassie Brilliant Blau gefärbt. Auch in Abwesenheit von IPTG erfolgte durch den tac-Promotor eine geringe Expression des GST-B4-His Proteins in den nichtinduzierten Proben. Als Längenstandard ist der See-Blue Marker (Invitrogen) verwendet worden.

III.5.2 Ist das B4-Protein ein immundominantes Antigen von *T. gondii* ?

Bei der Suche nach neuen immunologisch wichtigen Antigenen, bei der das B4-Protein erstmals entdeckt wurde, zeigte sich, dass das B4-Protein von dem zum Screenen benutzten humanen Antiserum erkannt wurde. Mit der Verfügbarkeit des rekombinanten B4-Proteins konnte jetzt analysiert werden, ob das B4-Protein von allen Seren von Toxoplasmen- infizierten Patienten erkannt wird.

Dazu wurden verschiedene humane Seren der diagnostischen Abteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf auf ihre Reaktivität mit dem rekombinanten Protein GST-B4-His im Western-Blot untersucht. Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über verschiedene Serumproben. Die Klassifizierung der Seren erfolgte durch den angegebenen Titer im Immunfluoreszenztest (IFT), der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) oder des Immunosorbent Agglutination-Assays (ISAGA). So sind die Personen in seronegative, chronisch und akut infizierte Patienten unterteilt.

Das Ergebnis mit 12 von insgesamt 34 Serumproben ist in Abbildung 16 dargestellt. Fünf von acht positiven Serumproben reagieren sehr deutlich mit dem rekombinanten GST-B4-His Protein.

Dabei war die Antigenerkennung unabhängig davon, ob eine akute oder eine chronische Infektion vorlag. Die positiv getesteten Seren haben mit dem B4-Protein reagiert und nicht mit dem GST-Fusionsanteil, da keines der getesteten Seren mit dem GST-Protein allein reagierte. Es ist bekannt, dass das GST-Protein, wegen der hohen Konservierung des GST-Gens, nur eine geringe Immunogenität in Säugetieren besitzt (Oettinger *et al.*, 1992).

Serum	IFT	KBR	ISAGA	Interpretation
1	1: 8192	1: 320	1: 12800	Akute Toxoplasmose
2	1:1024	1: 320	1: 81920	Akute Toxoplasmose
3	1: 2048	1: 320	1: 1638400	Akute Toxoplasmose
4	1: 512	1: 10	<1:3200	Chronische Toxoplasmose
5	1: 16	<1: 10	<1: 400	Chronische Toxoplasmose
6	1:4096	1:1280	1:151200	Akute Toxoplasmose
7	1:1024	1:160	1:25600	Akute Toxoplasmose
8	1:4096	1:40	1:400	Chronische Toxoplasmose
9	<1:16	<1:5	nd	Seronegativ
10	<1:16	<1:20	nd	Seronegativ
11	<1:16	<1:5	nd	Seronegativ
12	<1:16	<1:5	nd	Seronegativ

Tabelle 1: Diagnostische Untersuchungsergebnisse von Patientenseren

Titerangaben von: IFT= Immunfluoreszenztest; KBR= Komplement-Bindings-Reaktion; ISAGA= Immunosorbent-Agglutination Assay, nd= nicht durchgeführt.

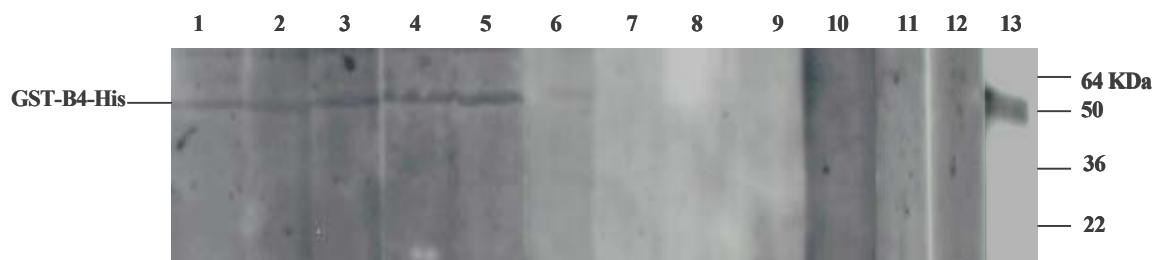


Abbildung 16: Reaktivität von humanen Seren mit rekombinantem GST-B4-His Protein.

Nach einer SDS-PAGE von 4 µg rekombinanten GST-B4-His Protein pro Spur wurde ein Immunoblot mit Serum von Toxoplasma-infizierten Patienten (siehe Tab.1) in einer Verdünnung von 1: 250 (Spur 1-8) durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden die Streifen (9-12) mit humanen Seren von nicht infizierten Patienten in der gleichen Verdünnung inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der Streifen 13 mit anti-B4-Antiserum beschichtet. Als Sekundärantikörpern wurde zur Analyse der Patientenproben ein anti-human Immunglobulin Antiserum verwendet.

Dieser Befund zeigt, dass Antikörper gegen das B4-Protein in der Mehrzahl der ausgetesteten Serumproben nachweisbar sind, dass jedoch nicht alle Seren von Patienten mit einer Toxoplasmose Antikörper gegen dieses Proteins enthalten. Als alleiniges Antigen für diagnostische Untersuchungen in Patienten ist das B4-Protein daher nicht geeignet, könnte aber in Kombination mit weiteren immundominanten Antigenen für diagnostische Zwecke benutzt werden.

III.5.3 Charakterisierung der Reaktivität des polyklonalen Antiserums gegen das B4-Protein

Wie bereits erwähnt wurde zur Charakterisierung des *T. gondii* B4-Protein ein polyklonales Antiserum gegen die immundominante C-terminale Region der „coiled-coil“ Struktur (AS 60-70) hergestellt. Dazu wurden Kaninchen mit einem synthetisierten Peptid immunisiert. Zuerst wurde das Prä-Immunserum sowohl mit dem *T. gondii* Lysat Antigen (TLA) als auch mit dem rekombinanten GST-B4-His Fusionsprotein getestet, um von der Immunisierung unabhängige und unspezifische Reaktionen detektieren zu können. Bei einer Verdünnung von 1:100 des Prä-Immunserums war keine Reaktivität mit dem rekombinanten B4-Protein feststellbar. Die Konzentration der Antikörper gegen das B4-Protein konnte anhand von Verdünnungsreihen ermittelt werden. Wie erwartet, reagiert der anti-B4-Antikörper mit dem rekombinanten GST-B4-His Fusionsprotein, das bei 54 kDa läuft (Abbildung 17, Spur 1) und nicht mit dem GST Protein (Abbildung 17, Spur 3).

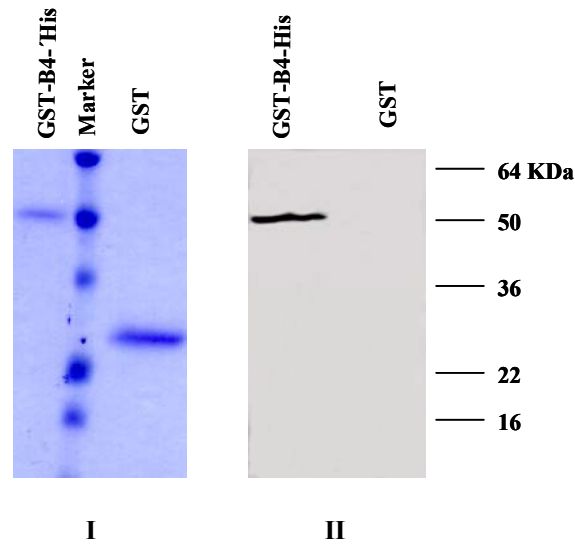


Abbildung 17: Gelelektrophoretische und Westernblot Analyse von GST- und GST-B4-His -Proteinen.

Die aufgereinigten Proteine GST und GST-B4-His wurden gelelektrophoretisch getrennt und entweder mit Comassie Brilliant Blau (I) gefärbt oder im Westernblot mit dem Anti-B4-Antikörper (II) immungefärbt. Als Längenstandard wurde der Low-range-Marker (Gibco) verwendet.

Um die Expression von nativem B4-Protein bei Tachyzoiten zu überprüfen, wurden aus frisch lysierten Parasiten des Stamms RH Toxoplasma-Lysat-Antigene (TLA) gewonnen und diese mit anti-B4-Antiserum inkubiert.

Der Western-Blot in Abbildung 18 zeigt, dass nur eine einzelne Bande bei 27 kDa im Tachyzoitenlysat (Spur 1) nachweisbar ist. Es wurden keine Kreuzreaktionen mit den Wirtszellen detektiert (Spur 3). Als Positivkontrolle wurde das rekombinante GST-B4-His Fusionsprotein mitgeführt (Spur 2).

Die Anwesenheit von Reduktionsmitteln wie DTT oder 2-Mercaptoethanol hatte keinen Einfluss auf das Laufverhalten des B4-Proteins in der SDS-PAGE. Das apparente Molekulargewicht des B4-Proteins war mit 27 kDa im Vergleich zum theoretischen Molekulargewicht von 19 kDa um 8 kDa erhöht. Diese Molekulargewicht-Abweichung wurde aber schon bei dem rekombinanten GST-B4-His Fusionsprotein beobachtet und diskutiert.

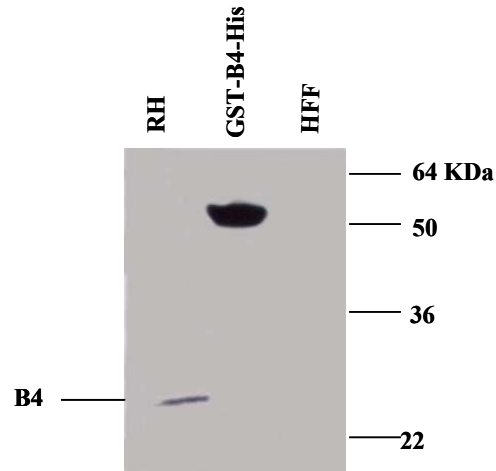


Abbildung 18: Western-Blot Analyse des B4-Protein aus TLA.

Das B4-Antiserum reagiert mit dem Toxoplasma-Lysat (Spur 1) und zeigt eine solitäre Bande mit einem Molekulargewicht von 27 kDa. Als Positivkontrolle fungiert das GST-B4-His Fusionsprotein (Spur 2). Die Negativkontrolle mit einer nicht infizierten HFF-Zellkultur (Spur 3) zeigt keine Reaktion. Für den gezeigten Western-Blot wurden je 10 µg Proteine pro Spur in einem 12%igen SDS-Gel aufgetragen, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem B4-Antiserum (1: 1000) markiert und mit einem sekundären anti-Kaninchen-Antikörper (1: 2000) detektiert.

Aus diesen Daten ergibt sich, dass das erhaltene Antiserum hochspezifisch mit dem B4-Protein reagiert und in weiteren Analysen zur Charakterisierung und Lokalisierung des B4-Proteins in Toxoplasmen verwendet werden kann.

III.5.4 Lokalisation des B4-Proteins in Tachyzoiten von *T. gondii*

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation des B4-Proteins in *T. gondii* wurden sowohl freie Tachyzoiten als auch intrazellulär gelagerte Tachyzoiten einem Immunfluoreszenznachweis mit den B4-spezifischen Antikörpern unterzogen, wobei sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper (cy³ oder cy²) verwendet wurde.

Bei den freien Tachyzoiten als auch bei intrazellulären Tachyzoiten konnte das B4-Protein mit Hilfe des B4-Antiserums im Zytosol des Parasiten nachgewiesen werden (Abbildung 19 A und B). Es wurde keine Kreuzreaktion des B4-Antiserums mit der Wirtszelle gesehen. Die als Kontrolle durchgeführte DAPI-Färbung, die spezifisch die DNA anfärbt, erlaubt die

Lokalisierung des Zellkerns der Wirtszelle als auch der Zellkerne der Toxoplasmen. Obwohl das B4-Protein, wie bereits erwähnt ein Motiv für die Translokation in den Kern besitzt, konnte das Protein in keinem der durchgeführten Ansätze im Zellkern nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass das B4-Protein, wie vorhergesagt, nicht zu den sekretorischen Proteinen gehört, wurden Doppelimmunfluoreszenz Analysen mit monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen Markerproteine von sekretorischen Organellen durchgeführt: MIC2 für Mikronemen und GRA2 für die „dense granula“. Es handelte sich um monoklonale Antikörper aus Mäusen, so dass eine Doppelimmunfluoreszenz mit dem polyklonalen Anti-*T. gondii* B4-Kaninchenserum möglich war. Es zeigt sich in keinem Fall eine Kolokalisierung des B4-Proteins mit den Mikronemen- oder mit den „dense granula“ Proteinen (Abbildung 20).

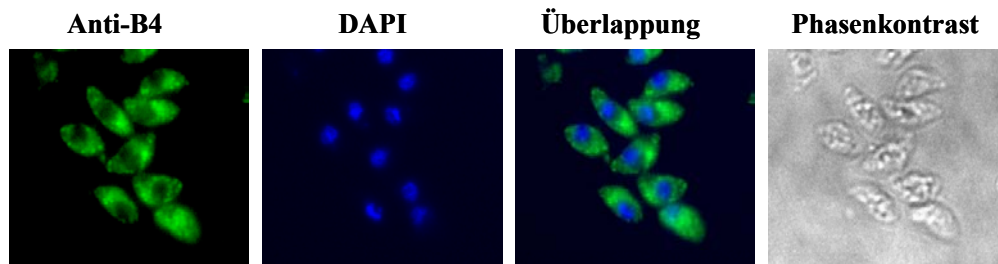


Abbildung 19 a : Lokalisation des B4-Proteins in freien Tachyzoiten

Frisch „geerntete“ freie Tachyzoiten wurden auf Deckgläser fixiert und dann mit B4-Antiserum 1:200 behandelt. Als Sekundärantikörper wurde ein mit Cy2-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper 1:200 verwendet. Für die Detektion der Toxoplasma-Zellkerne wurde DAPI verwendet.

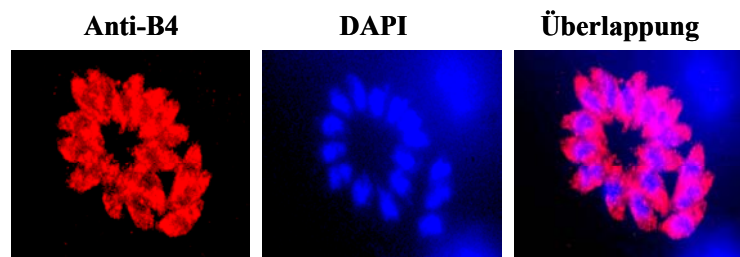


Abbildung 19 b: Intrazelluläre Lokalisation des B4-Proteins in *T. gondii* Tachyzoiten.

HFF-Zellen wurden 24 Stunden nach Infektion mit Tachyzoiten fixiert und dann in der Immunfluoreszenzfärbung mit B4-Antikörpern inkubiert. Der Nachweis der Antikörper-Bindung wurde mit Cy³-markierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Zellkern-DNA wurde mit DAPI angefärbt.

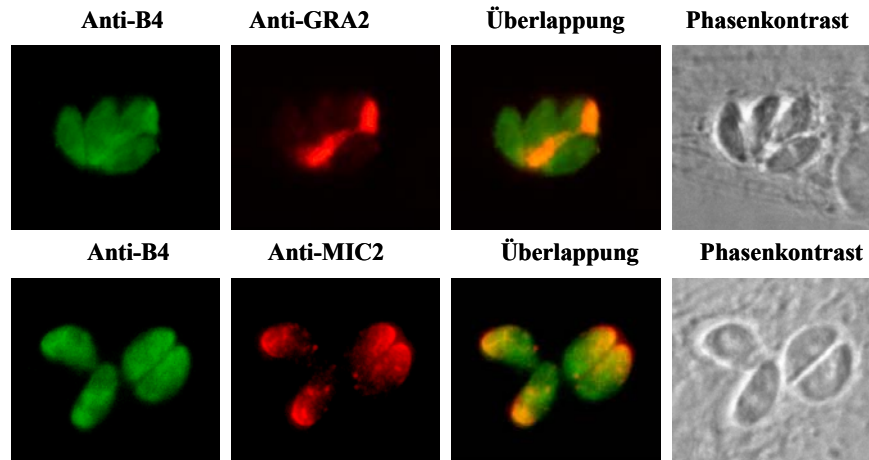


Abbildung 20: das B4-Protein zeigt keine Kolokalisation mit sekretorischen Proteinen

Die doppelte Immunfluoreszenz-Analyse wurde mit RH Toxoplasmen-infizierten HFF-Zellen durchgeführt. Die mit den Antikörpern gegen das MIC2- und GRA2-Protein dargestellten Antigene weisen keine Kolokalisation mit dem B4-Protein auf.

III.5.5 Expression des B4-Proteins in *T. gondii* Bradyzoiten

T. gondii kann während seines Lebenszyklus in drei verschiedenen Stadien vorkommen: als Tachyzoiten oder Bradyzoiten im Zwischenwirt und als Sporozoiten in ihrem Endwirt. Um die Expression des B4-Proteins im Bradyzoiten zu untersuchen, wurde beschlossen, in Kooperation mit Frau PD Gabi Reichman (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) die Expression des B4-Proteins bei Bradyzoiten durch indirekte Immunfluoreszenz zu überprüfen. Dafür wurden aus Hirnzellen chronisch infizierter Mäuse Zysten isoliert und in einem Doppelimmunfluoreszenztest auf die Expression sowohl des B4-Proteins als auch des Bradyzoiten-spezifischen 4F8-Antigen untersucht (Bohne *et al.*, 1993).

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass das B4-Protein auch in Bradyzoiten bzw. in Zysten vorhanden ist (Abbildung 21 Teil A). Mit dem mAk SAG1 wurden die Zysten nicht angefärbt, was drauf hindeutet, dass keine Kontamination der Bradyzoiten mit Tachyzoiten stattgefunden hat (Abbildung 21 Teil B). Bei Tachyzoiten lässt sich, im Gegensatz zu den Bradyzoiten, kein 4F8-Protein nachweisen, was die stadienspezifische Expression des Antigen 4F8 bestätigt (Abbildung 21 C).

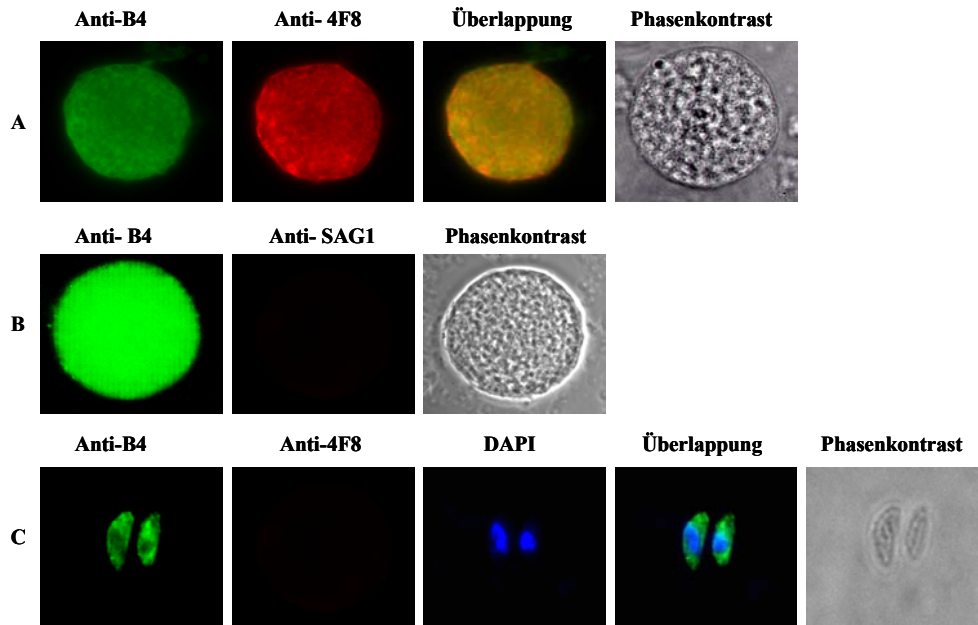


Abbildung 21: Expression des B4-Proteins in Tachyzoiten und Bradyzoiten.

Immunfluoreszenzanalyse mit Zysten von *T. gondii* Stamm DX (A-B) und von intrazellulären Tachyzoiten des *T. gondii* Stamms RH (C). Paraformaldehyd fixierte Präparate wurden in einer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen B4 und SAG1 bzw. den Bradyzoitenmarker 4F8 gefärbt. B4-spezifische Antikörper wurden mit Cy² markierten (grün), SAG1 bzw. 4F8 Antikörper mit Cy³-markierten (rot) Sekundärantikörpern nachgewiesen.

III.5.6 Analyse der subzellulären Verteilung des B4-Proteins

Die Immunfluoreszenz Analysen an Tachyzoiten mit dem polyklonalen B4-Antikörper hat die Lokalisation des B4-Proteins im Zytosol gezeigt. Um genauere Aussagen über die Wechselwirkungen des B4-Proteins mit Bestandteilen des Zytosols treffen zu können, wurden Tachyzoitenlysate mittels differentieller Ultrazentrifugation fraktioniert und die Anwesenheit des B4-Proteins in den verschiedenen Präparationen mittels Western-Blot analysiert.

Dazu wurden zunächst extrazelluläre Tachyzoiten durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen aufgeschlossen. Danach wurde das Lysat bei 2500 x g zentrifugiert um Reste der Zellbruchstücke, Organellen, nukleäre Komponenten und nicht völlig aufgeschlossene Parasiten zu pelletieren. Der dabei erhaltene Überstand enthält die zytosolischen Proteine und die membranösen Bestandteile und wird als „low speed supernatant“ (LSS) bezeichnet. Der LSS wurde dann mittels Ultrazentrifugation (100.000 x g) erneut aufgetrennt.

Das nach Ultrazentrifugation resultierende Pellet (membrangebundene Bestandteile) und der Überstand (lösliche Bestandteile) wurden getrennt, in 2x Probenpuffern auf ein 12%iges SDS-Gel geladen, geblottet und mit Anti-B4-Serum inkubiert. Als Kontrollantikörper wurde anti-*T. gondii*-GRA1 mAK verwendet, welche das GRA1-Protein erkennen, das als Markerprotein für vollständig lösliche Proteine dient (Lecordier *et al.*, 1999). Ferner wurden anti-*T. gondii*-SAG1-Antikörper eingesetzt, die das membrangebundene Oberflächenmolekül SAG1 erkennen (Manger *et al.*, 1998). Das Ergebnis dieser Analyse ist in der Abbildung 22 dargestellt. Das B4-Protein wurde überwiegend im „High speed supernatant“ (HSS) aber auch in geringerer Menge im „High speed pellet“ (HSP) Teil gefunden. Daraus kann man schließen, dass das B4-Protein in Toxoplasmen sowohl in einer löslichen als auch in einer membrangebundenen Form vorkommt. Die Abwesenheit des völlig löslichen GRA1 im HSP und des zelloberflächenassoziierten SAG1 im HSS bestätigen die komplette Trennung der löslichen Fraktion von der unlöslichen Fraktion.

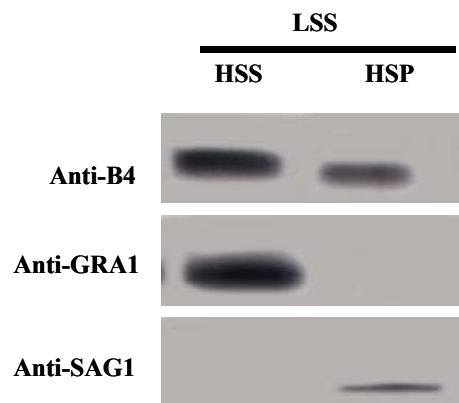


Abbildung 22: Subzelluläre Verteilung des B4-Proteins in den Tachyzoitenfraktionen

Das Gesamtlysate (LSS) von 2×10^8 Tachyzoiten wurde durch Ultrazentrifugation ($100.000 \times g$) in „high speed supernatant“ (HSS) und in „high speed pellet“ (HSP) getrennt. Die Fraktionen wurden danach in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit B4-, GRA1- und SAG1- Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit Peroxidase-markierten Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus Sekundärenantikörpern.

Obwohl die Analyse der Aminosäuresequenz des B4-Proteins ergab, dass B4 über keine putative Transmembranregion verfügt, zeigen die Befunde der Fraktionierung deutlich, dass das B4-Protein in Toxoplasmen sowohl löslich als auch in membrangebundener Form vorkommt.

III. 6 Analysen zur Funktionsbestimmung des B4-Proteins

Die bisherigen Befunde zeigen, dass es sich bei dem B4-Protein wahrscheinlich um ein zytosolisches Protein handelt, dass weder mit den sekretorischen Organellen assoziiert ist noch sezerniert wird. Die Immunfluoreszenz-Analysen ergaben vielmehr eine diffuse feinfleckige Verteilung des Proteins im gesamten Zytoplasma. Um weitere Aussagen zur möglichen Funktion des B4-Proteins treffen zu können wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen sollte versucht werden, durch die Erzeugung von B4- „knock-out“ Mutanten Hinweise für die Bedeutung des Proteins für den Parasiten zu erhalten. Ferner sollte untersucht werden, ob eine Überexpression des B4-Gens phänotypische Veränderungen an Toxoplasmen bewirkt.

III. 6.1 Erzeugung von B4-„Knock-out“ Mutanten

Um die Funktion des B4-Proteins charakterisieren zu können, sollte das B4-Gen durch homologe Rekombination mit einer Resistenzkassette ersetzt werden und der Phänotyp der resultierenden Δ B4 Mutante charakterisiert werden. In *T. gondii* nutzt man zu diesem Zweck die Methode der homologen Rekombination aus, indem man auf einem Plasmid den offenen Leserahmen des Zielgens durch Integration eines Selektionsmarkers unterbricht und dieses sogenannte „knock-out“-Plasmid in den Parasiten transfiziert (Donald and Roos, 1994). Da Tachyzoiten ein haploides Genom besitzen und B4 ein „single copy“ Gen ist, musste zu diesem Zweck nur eine einfache Integration des „knock-out“-Plasmids an seinen homologen Gen-Lokus im Wildtyp erreicht werden.

Da lineare DNA in *T. gondii* bevorzugt unspezifisch ins Genom integriert, sind zum gezielten Ausschalten bzw. Ersetzen von Genen durch doppelt homologe Rekombination lange Bereiche flankierender Regionen chromosomaler DNA erforderlich (Donald and Roos, 1994). Im Rahmen des *T. gondii* Genom-Projektes (www.toxodb.org) wurde das gesamte Genom von *T. gondii* sequenziert und putative Gene anhand des offenen Leserahmens lokalisiert. Dabei wurden auch die Sequenzinformationen der genomischen Sequenz „stromauf- und stromabwärts“ des B4-Lokus, wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt, ermittelt.

Die Herstellung des „knock-out“ Konstruktes wurde über Klonierung in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde über eine PCR mit dem Oligonukleotidpaar B4-SpeI und B4- NotI aus genomischer DNA von *T. gondii* des Stammes RH die 3'-UTR (1528 bp nach dem

Stopcodon TGA) amplifiziert und nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI*/*NotI* in den Vektor pTub1-CAT (freundliche Gabe von Prof. Soldati, Schweiz) einkloniert. Man erhält den Zwischenvektor pTub1-CAT-3'B4. Im nächsten Schritt wurde die 5'-UTR (1349 bp ab dem Startcodon ATG) mit dem Oligonukleotidpaar *ApaI*-B4 und *ClaI*-B4 amplifiziert und nach Verdau mit *ApaI*/*ClaI* in den Zwischenvektor pTub1-CAT-3'B4 einkloniert. Das erhaltene „knock-out“-Konstrukt pTub1-5'B4-CAT-3'B4 wurde durch analytischen Verdau und partielle Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft. In der Abbildung 23 ist schematisch der B4-Genloкус, das „knock-out“-Plasmidkonstrukt pTub1-5'B4-CAT-3'B4 und der B4-Lokus nach Austausch des B4-ORFs dargestellt.

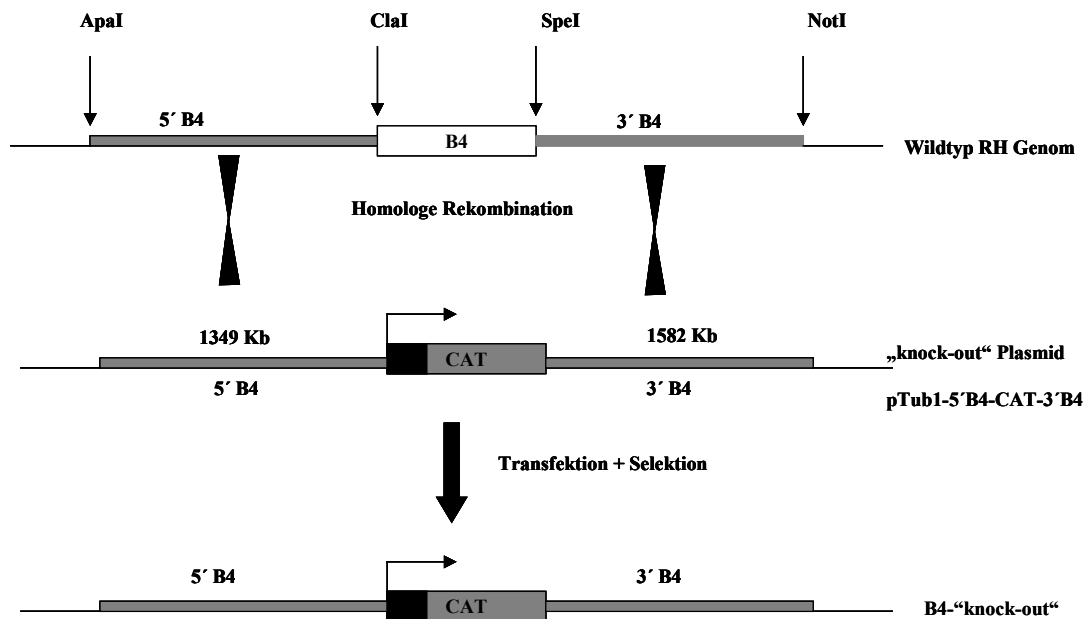


Abbildung 23: Schematische Darstellung zur Erzeugung des „knock-out“-Vektors für die Herstellung der B4-defizienten Mutanten ($\Delta B4$).

Das Plasmid zur Generierung der $\Delta B4$ -Mutante enthält 1349 bp des 5'UTR, 1582 bp des 3'UTR und 659 bp lang CAT-ORF. Der ORF von B4 wird durch homologe Rekombination mit dem CAT-ORF ersetzt. Die Transfektion erfolgt durch Elektroporation. Der Tub-1 Promotor ist als schwarze Box gekennzeichnet.

Mit dem pTub1-5'B4-CAT-3'B4-Konstrukt wurden in mehreren unabhängigen Ansätzen RH-Parasiten mittels Elektroporation transfiziert, wobei in jeder Transfektion unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA eingesetzt wurden.

Nach etwa 10 bis 21 Tagen, unter ständiger Chloramphenicolselektion, wurden die überlebenden Parasiten „geerntet“ und mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht.

Die Population der Chloramphenicol-resistenten Toxoplasmen erwies sich nach den Immunfluoreszenzanalysen allerdings noch immer als heterogen (Abbildung 24). Während anti-SAG1 die Plasmamembranen aller Parasiten anfärbt, detektiert der anti-B4 nur die Wildtyp-Parasiten. Die B4-Knock-out-Parasiten waren mit anti-B4-Antikörpern negativ. Die DAPI-Färbung zeigt die Zellkerne der beiden heterogenen Populationen.

Damit ist gezeigt, dass nach Transfektion mit dem „knock-out“-Plasmid tatsächlich B4- „knock-out“-Mutanten entstehen.

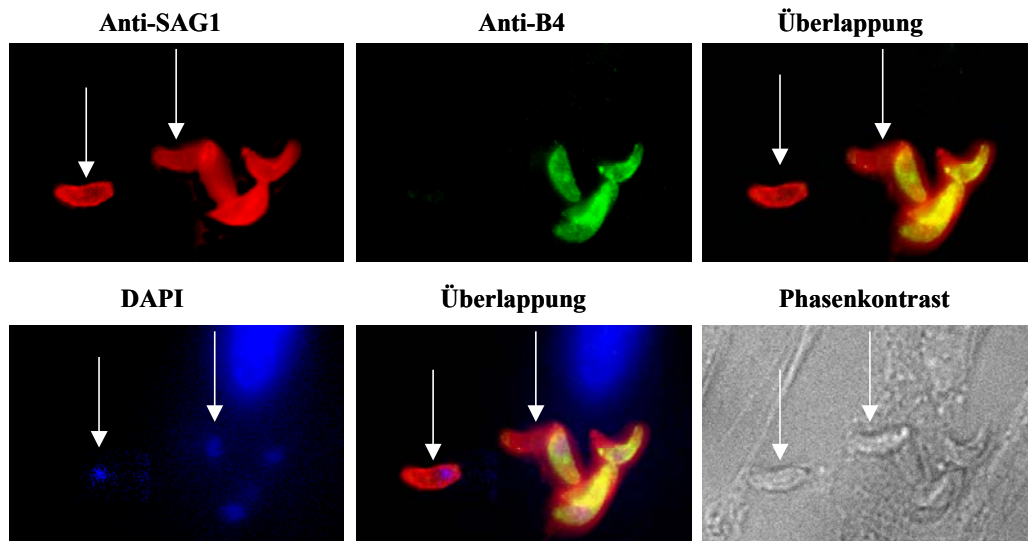


Abbildung 24: „Knock-out“-Mutanten (Δ B4) exprimieren kein B4-Protein.

Tachyzoiten des Stammes RH wurden mit dem „knock-out“ Plasmid transfiziert. Nach drei Wochen unter Selektion mit Chloramphenicol wurden die Parasiten mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und mit Antikörpern gegen B4 als auch gegen SAG1 inkubiert. B4-Antikörper wurden mit Cy²-markierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht, während anti-SAG1 mit Cy³-markierten Sekundärantikörpern detektiert wurde. Zellkern-DNA wurde mit DAPI gefärbt. Die weißen Pfeile zeigen zwei „knock-out“-Toxoplasmen, die das B4-Protein nicht mehr exprimieren.

Als nächstes Ziel wurde versucht die B4-„kock-out“-Parasiten in Reinkultur darzustellen. Durch Weiterkultivierung der transfizierten Parasiten unter Chloramphenicol konnte keine Reinkultur gewonnen werden, spätestens nach 5 Wochen unter Selektion waren keine viablen Toxoplasmen mehr vorhanden. Alternativ wurde mehrmals eine Grenzwertverdünnung „limiting dilution“ der heterogenen Parasitenpopulationen drei Wochen nach Transfektion durchgeführt. Diese Grenzwertverdünnung wurde sowohl unter Chloramphenicolselektion als auch ohne Antibiotikazugabe durchgeführt. Die Klonierung unter Selektionsbedingungen führte zu einem Absterben aller Klone. Auch die Klonierung ohne Antibiotikagabe führte nur zur Isolation von Wildtypparasiten, „knock-out“-Mutanten konnten nicht isoliert werden. Diese Arbeiten wurden unter unterschiedlichen Selektionsmethoden (Klonierungen zu unterschiedlichen Zeiten nach der Transfektion, Verwendung verschiedener Dosen von Chloramphenicol) über mehr als 12 Monate durchgeführt.

Da es jedoch unmöglich war Reinkulturen der „knock-out“-Parasiten zu erzeugen, konnte keine exakte phänotypische Analyse der Mutanten erfolgen. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass die Ausschaltung des B4-Gens mit dem Überleben des Parasiten nicht vereinbar ist. Weitere Untersuchungen, ob es sich bei den B4-„knock-out“-Mutanten tatsächlich um eine letale Mutation handelt, z.B. mit si-RNA oder durch Erzeugung von „knock-in“ Mutanten konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen leider nicht mehr durchgeführt werden.

III.6.2. Expression von rekombinantem B4-Protein in Tachyzoiten von *T. gondii*

Um die Funktion von Proteinen in Organismen zu untersuchen, werden häufig deren Gene ausgeschaltet oder überexprimiert. Die dadurch eventuell auftretenden Defekte können Rückschlüsse auf die biologische Bedeutung des Proteins ermöglichen. Die zunächst gewählte Strategie der Erzeugung von knock-out Mutanten führte leider nicht zu dem gewünschten Ziel.

Das Ergebnis aus der semiquantitativen B4 RT-PCR hat gezeigt, dass das B4-Gen im Vergleich zu SAG1 oder β -Tubulin nur schwach transkribiert wird (Abbildung 10). Unser Ziel war es daher, jetzt zusätzliche B4-Proteine in Tachyzoiten zu exprimieren. Dazu wurde das B4-Gen mit GFP-, YFP- oder dem Myc-Epitop am C-Terminus fusioniert und die Parasiten mittels Elektroporation transfiziert.

III.6.2.1 Transiente Transfektion von *T. gondii* Tachyzoiten mit pTub8-B4-GFP

Das „green-fluorescent“ Protein (GFP) aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* wird als Reportergen verwendet, um den Aufenthaltsort von Proteinen in vivo darzustellen. Die cDNA von GFP wurde schon 1992 kloniert (Prasher *et al.*, 1992) und kodiert ein 238 Aminosäuren langes, 27 kDa schweres Protein mit einer chromophoren Gruppe. Das Chromophor ist durch die intramolekulare Zyklisierung von drei Aminosäuren (Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷) entstanden. Nach Anregung mit kurzzeitigem Licht im blauen Absorptionsbereich (Absorptionsmaximum bei 395 nm) emittiert das Protein bei einem Emissionsmaximum von 508 nm. Diese Wellenlänge liegt im grünen Spektralbereich. Mit GFP markierte Proteine können in lebenden Zellen entweder durch direkte Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht oder in fixierten Zellen mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie zusätzlich dargestellt werden. Durch die Fusion des B4-Proteins mit „green fluorescent“ Protein und der Expression in *T. gondii* Tachyzoiten sollten zunächst die mittels Immunfluoreszenz mit anti-B4-Antikörpern erhaltenen Daten zur Lokalisation des B4-Proteins bestätigt werden.

Mit Hilfe einer PCR-Reaktion und den Primern EcoRI-B4 und B4-NsiI, die am Start und Stopcodon der B4-cDNA binden, wurde der gesamte offene Leserahmen der B4-cDNA amplifiziert. Mittels der in den Primern enthaltenen Schnittstellen (*EcoRI* und *NsiI*) konnte das PCR-Produkt in den pTub8-GFP Vektor kloniert werden. Der resultierende Vektor erhielt den Namen pTub8-B4-GFP. Dabei steht die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten TUB8 Promotors. 1×10^8 RH-Tachyzoiten wurden mit 60 µg pTub8-B4-GFP-Plasmid transfiziert und die Expression der Transgene nach 20 Stunden durch Immunfluoreszenzanalyse verifiziert. Bei dieser transienten Transfektion bleibt der Vektor nur vorübergehend in der Zelle, folglich findet die Expression des B4-GFP Fusionsproteins nur für einen begrenzten Zeitraum statt.

Bei freien Tachyzoiten als auch bei intrazellulären Parasiten zeigt das B4-GFP Fusionsprotein die gleiche zytoplasmatische Verteilung wie das native B4-Protein (Abbildung 25a und 25b). Als Kontrolle wurde der Vektor pTub8-GFP ohne B4-cDNA Insert verwendet. Dabei ist bekannt, dass das GFP Protein allein, ohne Fusionsprotein, die Tendenz hat, sich im Zellkern anzureichern (Hettmann *et al.*, 2000). Dies war auch bei meinen Experimenten erkennbar (Abbildung 25c) und gibt einen Hinweis darauf, dass die zytoplasmatische Verteilung des B4-GFP Fusionsproteins auf den B4 Proteinanteil zurückzuführen ist.

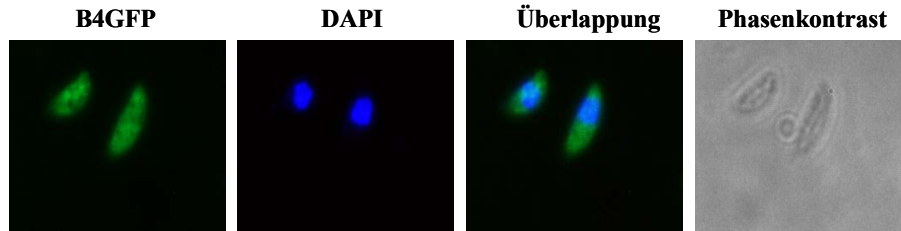


Abbildung 25a: Transiente Expression von B4-GFP Fusionsprotein bei freien Tachyzoiten.

20 Stunden nach Transfektion der Tachyzoiten mit dem pTub8-B4-GFP Plasmid wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse mit GFP durchgeführt. Die Zellkern-DNA wurde mit DAPI angefärbt.

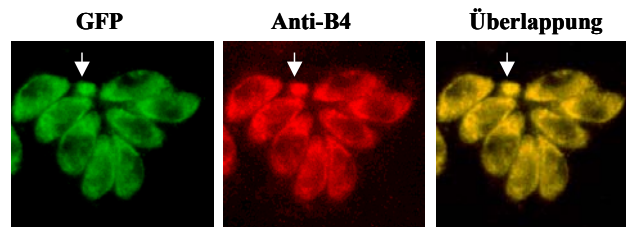


Abbildung 25b: Transiente Expression des B4-GFP Fusionsproteins bei intrazellulären Tachyzoiten.

Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von intrazellulären Tachyzoiten, die das B4-GFP Fusionsprotein exprimieren. Es zeigt sich eine eindeutige Kolo-kalisation von B4 mit B4-GFP. Die weißen Pfeile zeigen entstandene Residualkörper an der posterioren Seite der Parasiten.

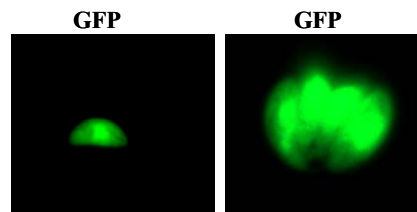


Abbildung 25c: Transiente Expression des GFP-Proteins bei RH Tachyzoiten

Direkt-Immunfluoreszenz-Analyse von intrazellulären Tachyzoiten, die GFP exprimieren. Das GFP-Protein zeigt eine eindeutige Kern-Lokalisation.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Verteilung des B4-GFP Fusionsproteins in den Tachyzoiten der Verteilung des nativen B4-Proteins entspricht. Bei der Analyse der intrazellulären Parasiten ergab sich jedoch, dass bei den RH-B4-GFP Mutanten eine Struktur nachweisbar ist, die phänotypisch den in der Literatur beschriebenen Residualkörpern entspricht (siehe Pfeile in Abbildung 25 b). Um dies weiter abzuklären war die Erzeugung von stabilen Mutanten erforderlich.

III.6.2.2 Stabile Expression von B4-YFP Fusionsproteinen in RH-Toxoplasmen

Die stabile Transfektion der RH-Tachyzoiten mittels Elektroporation erfolgte durch die sog. REMI-Methode („restriction enzyme mediated integration“), bei der die Effizienz der Integration von Fremd-DNA in das Genom dank einer Anregung des DNA-Reparatursystems gesteigert wird (Black *et al.*, 1995; Schiestl and Petes, 1991).

Zunächst musste das B4-Gen in das pTubYFP-YFP/sagCAT-Plasmid einkloniert werden. Dafür wurde an der B4-cDNA über PCR am 5'-Ende eine *SpeI* und am 3'-Ende eine *BglII* Schnittstelle angefügt und das Produkt an den Platz des ersten YFP in den Vektor pTubYFP- YFP/sagCAT (freundliche Gabe von Boris Stripen, Athens, USA) einkloniert. Der resultierende Vektor erhielt den Namen pTub-B4-YFP/sagCAT. Das „yellow-fluorescent“-Protein (YFP) mit 27 kDa stellt eine genetische Variante des Wildtyp-GFP dar, bei der eine Mutation außerhalb des Chromophors zu einer verbesserten Faltung und damit zu einer verstärkten grünen Fluoreszenz führte.

Ferner kodiert das Plasmid TubYFP-YFP/sagCAT für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) und ermöglicht die Selektion von Chloramphenicol-resistenten Transfektanten. 1×10^8 RH-Tachyzoiten wurden mit 60 µg pTub-B4-YFP/sagCAT-Plasmid transfiziert. Die Lokalisation des B4-YFP Fusionsproteins wurde etwa 24-36 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe der direkten und indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Auch hier ergab sich eine Lokalisation der B4-YFP-Fusionsproteine im Zytoplasma der Tachyzoiten (Abbildung 26).

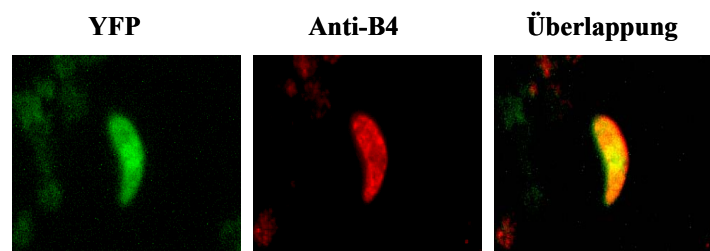


Abbildung 26: Stabile Expression von B4-YFP-Fusionsproteinen in RH-Toxoplasmen.

Immunfluoreszenz-Analyse mit Tachyzoiten aus HFF-Zellen 36 Stunden nach Transfektion mit pTubB4-YFP/sagCAT-Plasmid. Paraformaldehyd-fixierte Präparate wurden in der indirekten Immunfluoreszenz mit B4-Antikörper gefärbt. Der Nachweis erfolgte mit Cy³-markierter Sekundärantikörper.

Zur Isolation stabiler *T. gondii* Transfektanden wurde dem Zellkulturmedium nach 24 Stunden Chloramphenicol (20 μ M) zugesetzt. Die Wirkung von Chloramphenicol auf *T. gondii* ist etwas verzögert, wodurch die Parasiten etwa 20 bis 25 Teilungen durchlaufen müssen, also etwa dreimal den Wirtszellrasen lysieren, bevor die Selektion überhaupt wirkt (Kim *et al.*, 1993). Nach ca. zwei Wochen unter ständiger Chloramphenicolselektion wurden die überlebenden Parasiten als resistent beurteilt. Die resultierende *T. gondii*-Linie wurde RH-B4-YFP genannt.

Die Synthese des B4-YFP Fusionsproteins durch RH-B4-YFP Parasiten wurde im Immunoblot mit dem kreuzreagierenden anti-GFP spezifischen Antikörper als auch mit anti-B4-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 27). Wie erwartet, war die Größe des detektierten Proteins B4-YFP in guter Übereinstimmung mit den zuvor berechneten molekularen Massen.

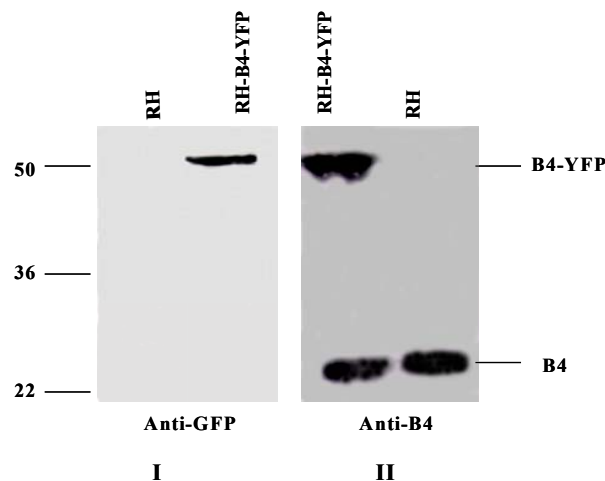


Abbildung 27: Western-Blot-Analyse von Lysaten von RH und RH-B4-YFP Parasiten.

Es wurde das Gesamtprotein aus 6×10^6 Toxoplasmen je Spur von RH und RH-B4-YFP-Parasiten mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblotet und mit Anti-GFP- (I) oder mit Anti-B4-Antikörpern (II) inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit Peroxidase-markierten Anti-Kaninchen-Antikörpern.

Die Expression des B4-YFP Fusionsproteins durch RH-B4-YFP Parasiten wurde auch mittels eines Fluoreszenz-aktivierten-Zell-Sortierers (FACS) analysiert. Abbildung 28 zeigt einen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenz zwischen dem Wildtyp RH und den Mutanten RH-B4-YFP-Parasiten. Ferner zeigt die FACS Analyse eindeutig, dass in der RH-B4-YFP Toxoplasmenlinie alle Parasiten das B4-YFP Fusionsprotein exprimieren. Diese Beobachtung konnte auch mikroskopisch in der direkten und indirekten Immunfluoreszenz bestätigt werden.

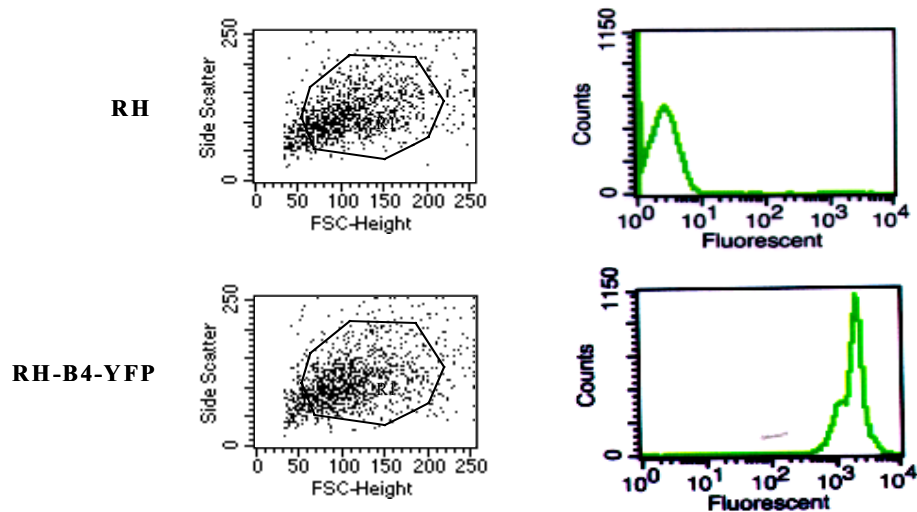


Abbildung 28 : Direkt-Nachweis des B4-YFP Fusionsproteins in RH-B4-YFP-Parasiten mittels FACS.

Je 10^6 frisch geerntete RH und RH-B4-YFP-Parasiten wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert und in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde vor jeder Messung kräftig gemischt (Vortex). Die Messung wurde mit dem FACScan-Gerät der Firma Becton Dickinson durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die Residualkörper ähnliche Struktur, wie sie in den transient transfizierten RH-B4-GFP Mutanten beobachtet wurde, auch bei den stabilen RH-B4-YFP Mutanten nachweisbar ist, wurden intrazelluläre Toxoplasmen mittels Immunfluoreszenz analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 29 dargestellt.

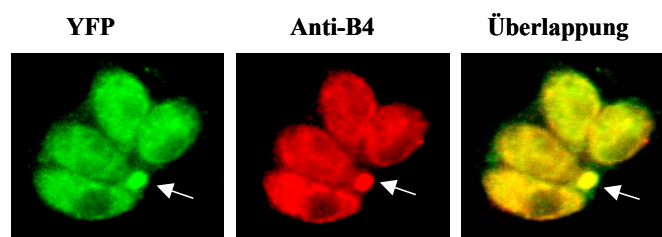


Abbildung 29: Stabil Expression von B4-YFP Fusionsprotein in RH-Toxoplasmen.

Gezeigt ist die direkte Immunfluoreszenz Analyse mit YFP. Die indirekte Immunfluoreszenzenanalyse wurde mit anti-B4 Antikörper durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit Cy³-markierten Sekundärantikörpern. Die weißen Pfeile zeigen den entstandenen Residualkörper an der posterioren Seite der Parasiten.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es auch in RH-B4-YFP Mutanten zur Ausbildung von Residualkörpern kommt. Um auszuschließen, dass die relativ großen Fremdproteinanteile bei den B4-GFP bzw. B4-YFP Fusionsproteinen Ursache für die Entstehung der Residualkörper sind, wurde eine zusätzlich eine RH-B4-Myc Mutante erzeugt.

III.6.2.3 Stabile Expression von B4-Myc Fusionsproteinen in RH-Toxoplamen

Um der physiologischen Verteilung des B4-Proteins möglichst nahe zu kommen, wurde das B4-Protein mit einem Myc-Epitop das aus nur 12 Aminosäuren besteht, am C-Terminus fusioniert. Als Grundlage für die Konstruktion des *T. gondii* Expressionsvektors, der die Transkription des B4-Gens stark exprimiert, diente das Plasmid pTub-Myc. In diesem Vektor steht das B4- Gen unter der Kontrolle eines starken β -Tubulin-Promotors von *T. gondii*. Ferner trägt das Plasmid eine Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) als Selektionsmarker.

Da die Überexpression von Protein in *T. gondii* in einigen Fällen zusätzliche, unspezifische phänotypische Eigenschaften vermitteln könnte, wurde als positive Kontrolle die cDNA des LDH1-Proteins in das gleiche Plasmid einkloniert. Die beiden Fusionsproteine B4-Myc und LDH1-Myc können dann mit einem anti-Myc-Antikörper nachgewiesen werden. Es wurden je 1×10^8 RH-Parasiten durch Elektroporation mit 60 μ g pTub-B4-Myc bzw. pTub-LDH1-Myc Expressionsplasmiden transfiziert, welche zuvor mit *NotI* linearisiert worden waren. Direkt nach der Elektroporation wurden die Parasiten auf einen konfluenten HFF Zellrasen gegeben und für 24-36 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert und in einer Immunfluoreszenzfärbung dargestellt.

Die transformierten Parasiten, welche das B4-Myc als auch das B4-native Protein exprimieren, lassen sich mit Anti-Myc-Antikörpern als auch mit B4-spezifischen Antikörpern anfärben. Die Parasiten, die keine modifizierten Proteine exprimieren, sind nur mit den B4-spezifischen-Antikörpern gefärbt (Abbildung 30 Teil A). Die subzelluläre Verteilung des B4-Myc-Proteins ist zytoplasmatisch und stimmt damit mit der Verteilung des nativen Proteins B4 überein. Diese Resultate wurden durch die doppelte Markierung desselben Proteins mit anti-Myc-Antikörper als auch mit B4-spezifischen Antikörpern bestätigt.

Bei weiterer Betrachtung fällt auf, dass nur die Kolonie, die das B4-Myc Fusionsprotein produziert, einen Residualkörper an der posterioren Seite der Parasiten ausbildet.

Die zur Kontrolle erzeugten LDH1-Myc Fusionsprotein exprimierenden Parasiten bilden keine Residualkörper aus (Abbildung 30 Teil B) Ferner zeigt diese Abbildung auch die erwartete Lokalisation des LDH1-Myc im zytosolischen Bereich, wie vorher z.B. von Reichmann et al. 2001 beschrieben.

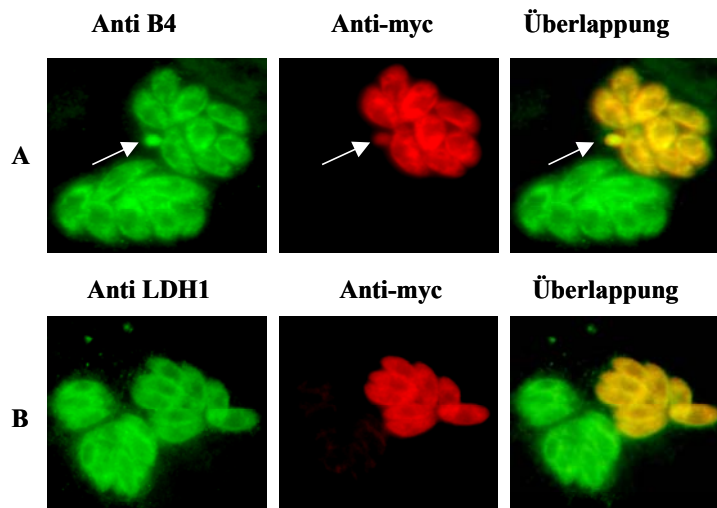


Abbildung 30 : Transiente Expression von B4-Myc- und LDH1-Myc- Protein im *T. gondii* RH.

Doppelte Immunfluoreszenzanalyse intrazellulärer Tachyzoiten in HFF-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit pTub-B4-Myc (A) bzw. pTub-LDH1-Myc (B) Plasmiden. Paraformaldehyd-fixierte Präparate wurden mit Anti-Myc, Anti-LDH1- und anti-B4-Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit Cy² – bzw. Cy³ – markierten Sekundärantikörpern. Die weißen Pfeile zeigen den entstandenen Residualkörper an der posterioren Seite der RH-B4-Myc-Parasiten.

Die Entstehung von Residualkörpern ist ein Phänomen, das schon beobachtet wurde, als das Myosin B/C-Proteine bei *T. gondii* überexprimiert wurde (Delbac *et al.*, 2001). Interessanterweise führte auch die Überexpression des B4-Proteins sowohl bei RH-B4-GFP-, RH-B4-YFP- und RH-B4-Myc-Parasiten, zur Entstehung von Residualkörpern.

Für weitere Experimente wurden die erzeugten RH-B4-Myc Mutanten weiter unter Selektionsdruck expandiert und anschließend kloniert. Dadurch konnten stabile Klone erhalten werden. Diese Klone wurden mittels Immunoblot weiter charakterisiert.

Die Analyse mit B4-spezifischen Antikörpern zeigte sowohl für den Wildtyp RH als auch für den RH-B4-Myc-Klon eine Bande bei ca. 27 kDa. Das angefügte Myc-Epitop mit nur 1,3 kDa hatte keinen erkennbaren Einfluss auf das Laufverhalten des B4-Myc Proteins im Vergleich zu dem des nativen B4 Proteins. Für die RH-LDH1-Myc-Mutanten ergab die Westernblotanalyse ein ähnliches Bild (Abbildung 31).

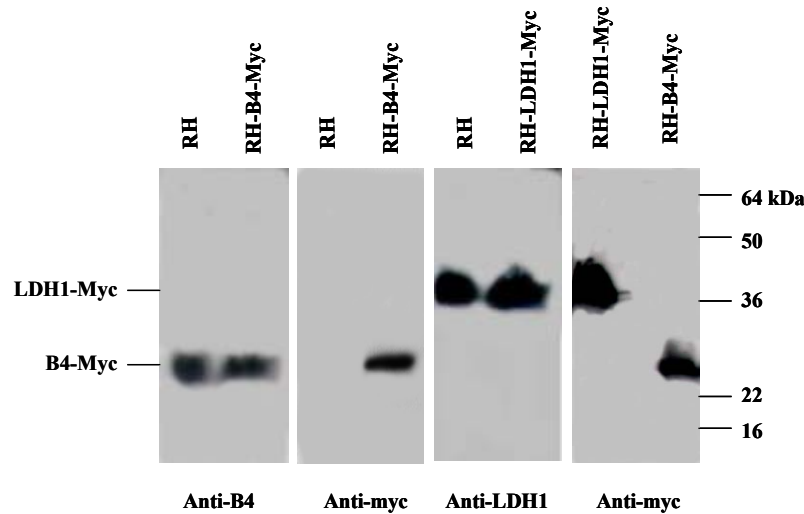


Abbildung 31: B4 und LDH1 Expression in klonierten RH-B4-Myc und RH-LDH1-Myc Parasiten.

Je 2×10^6 Zellen wurden pro Spur auf ein 12%iges SDS-Gel geladen, geblottet und zuerst mit B4- 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, welches über Peroxidase markierten anti-Maus-IgG-Antikörpern nachgewiesen wurde.

Auch bei den stabil transfizierten RH-B4-Myc Mutanten kam es während der intrazellulären Vermehrung zu einer Ausbildung von Residualkörpern, die im folgenden genauer charakterisiert wurden.

III.7 Funktionelle Analyse von RH-B4-Myc und RH-B4-YFP Mutanten

Über die Residualkörper bei Toxoplasmen ist bisher nur wenig bekannt. Am besten charakterisiert sind bisher die Residualkörper, die nach einer Behandlung von Toxoplasmen mit Cytochalasin D entstehen. Cytochalasin D ist ein Mykotoxin, welches spezifisch mit Aktin interagiert und zu einer Umorganisation des Mikrofilamentsystems führt (Shaw *et al.*, 2000). Dabei wurde gezeigt, dass die Residualkörper von einer Toxoplasmenmembran umgeben sind, sekretorische Organellen, Mitochondrien und Apicoplast enthalten. Analog zu den dort beschriebenen Methoden wurden nun auch die Residualkörper, die in RH-B4-Myc Mutanten entstehen, analysiert.

III.7.1 Charakterisierung der Residualkörper

Die Abbildung 32 Teil A zeigt Immunfluoreszenzanalysen mit RH-B4-Myc-Tachyzoiten, in denen der entstandene Residualkörper in keinem Fall mit DAPI an färbbar war. Die Färbung der Residualkörper mit anti MIC2-Antikörpern war ebenfalls negativ (Abbildung 32 Teil B). Der Nachweis, dass die in RH-B4-Myc Mutanten entstehenden Residualkörper parasitären Ursprungs sind, wurde durch Immunfluoreszenz-Analyse mit anti-SAG1-Antikörpern erbracht. Dabei detektieren anti-SAG1-Antikörper die Plasmamembran der Parasiten als die Membran um die Residualkörper (Abbildung 32 Teil C).

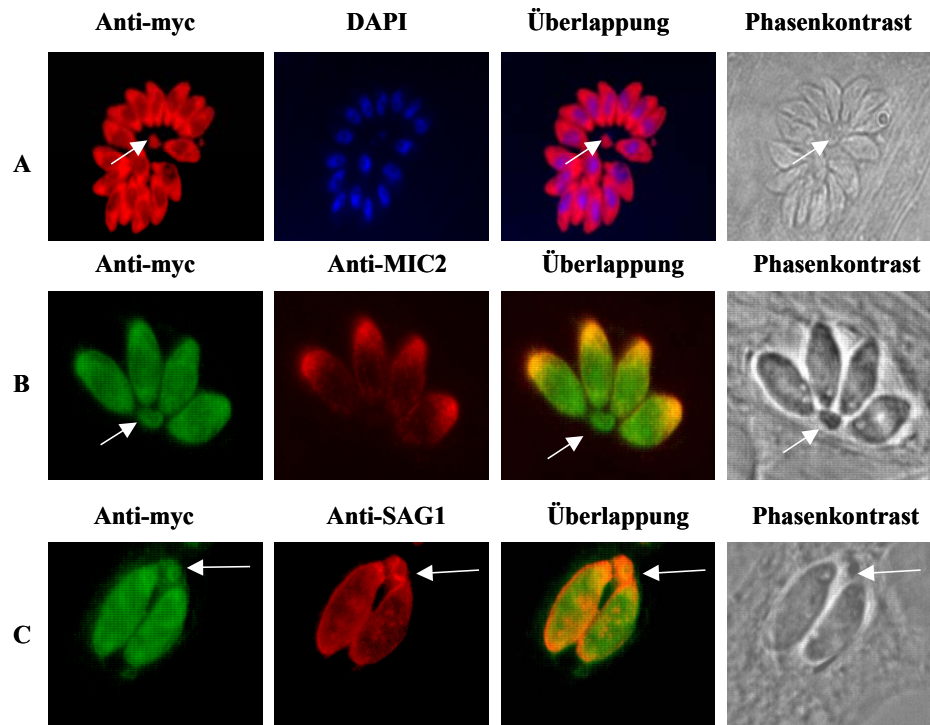


Abbildung 32: Charakterisierung der Residualkörper bei RH-B4-Myc Mutanten.

HFF-Zellen wurden für 24 Stunden mit RH-B4-Myc-Parasiten infiziert, anschließend mit 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert und dann mit DAPI bzw. mit anti-B4-, anti MIC2- und anti SAG1-Antikörpern behandelt. Der Nachweis erfolgte mit Cy² (Teil B und C) – bzw. Cy³ (Teil A)– markierten Sekundärantikörpern. Die Pfeile zeigen die entstandenen Residualkörper.

Damit ist eindeutig gezeigt, dass sich die nach Cytochalasin D Behandlung entstehenden Residualkörper deutlich von denen unterscheiden, die in RH-B4-Myc Parasiten auftreten. Die Residualkörper in den B4-Fusionsprotein-exprimierenden Toxoplasmen enthalten im Gegensatz zu denen, die nach Cytochalasin D Behandlung entstehen, keinen Kern und keine sekretorischen Organellen. Phänotypisch entsprechen die in RH-B4-Myc Parasiten vorzufindenden Residualkörperchen am ehesten denen, die nach einer Überexpression von Myosin B/C in Toxoplasmen entstehen (Delbac *et al.*, 2001).

III.7.2 Wachstumsbestimmung mit RH-B4-Myc und RH-B4-YFP Mutanten

Das Wachstum von Toxoplasmen kann man mit der ^3H -Uracil-Inkorporationsmethode quantitativ erfassen. Dies beruht auf der Fähigkeit des Parasiten, im Gegensatz zu seiner Wirtszelle, ^3H -markiertes Uracil in seinem Stoffwechsel verwerten zu können. Das liegt daran, dass Toxoplasmen aufgrund der erhöhten Aktivität des Enzym Uridin-Phosphorylase sehr gut externes Uracil für die Nucleotidsynthese verwenden können. Im Vergleich zur Wirtszelle ist die Aktivität dieses Enzyms bei *T. gondii* 100fach stärker (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977). Die Radioaktivität des so in die Nukleinsäure des Parasiten eingebauten Uracils kann gemessen werden und steht im direkten Zusammenhang zur Proliferation der Toxoplasmen.

Die ^3H -Uracil-Aufnahme wurde in vier 24-stündigen Intervallen gemessen. Die Abbildung 33 zeigt bei allen eingesetzten Infektionsdosen ein signifikant unterschiedliches Wachstum zwischen den Wildtyp RH- und den B4-Fusionsprotein-exprimierenden Mutanten. Dabei ist das Wachstum der Mutanten um ca. 30% niedriger als das der Wildtypparasiten. Als Kontrolle wurde die Proliferation der RH-LDH1-Myc Mutanten untersucht. Diese zeigen keinen signifikanten Unterschied zur Proliferationsrate der Wildtyp Parasiten. Dies lässt darauf schließen, dass die Überexpression des B4-Proteins in Tachyzoiten eine negative Wirkung auf das Wachstum der Parasiten hat.

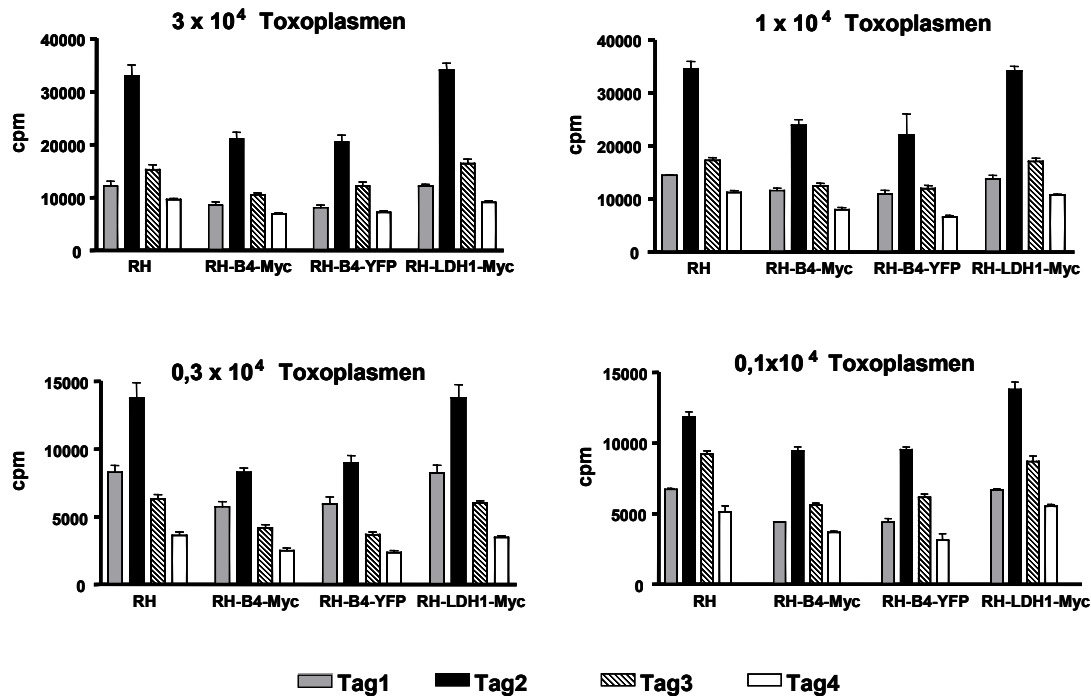


Abbildung 33: *In vitro* Proliferation von RH, RH-B4-Myc-, RH-B4-YFP- und RH-LDH1-Myc- Toxoplasmen.

Je 3×10^4 86HG39-Zellen wurden in 96-well-Platten mit verschiedenen Dosen von RH, RH-B4-Myc-, RH-B4-YFP- und RH-LDH1-Myc- Toxoplasmen infiziert. Jeder Ansatz wurde in vier 24-stündigen Intervallen mit 37 kBq pro Well mit ^3H -Uracil markiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde nach insgesamt 24 Stunden Inkubation gemessen.

Um zu überprüfen, ob die Überexpression des B4-Protein generell zu einer Reduzierung des Zellwachstums führt, wurde das Toxoplasma B4-Gen in humanen Zellen exprimiert (Abbildung 34a). Dazu wurde die B4-cDNA in den EGFP-Expressionsvektor EGFP-C1 einkloniert, der mittels Elektroporation in 86HG39-Zellen (Astrozytomzellen) verbracht wurde. Die Selektion stabil transfizierter 86HG39-Zellen mit Geneticin (G418) nahm 4-6 Wochen in Anspruch und wurde beendet, sobald die Platte mit untransfizierten Kontrollzellen keine lebenden Zellen mehr aufwies. Die Zellen wurden wieder mittels Immunfluoreszenz-Analyse untersucht (Abbildung 34b). Dabei zeigt sich, dass das B4-EGFP-Protein als Punktmuster im Zytosol vorliegt. Als Kontrolle wurde das EGFP Gen ohne B4 Sequenzen benutzt, welches sich homogen im Zytosol lokalisiert.

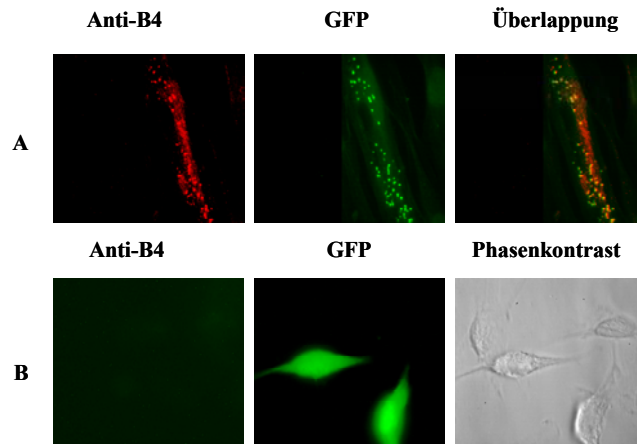


Abbildung 34a: Transiente Expression von B4-Protein in humanen 86HG39-Zellen.

86HG39-Zellen wurden mit pB4-EGFP (A) oder pEGFP-C1 (B) Plasmiden transient transfiziert. 36 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit anti-B4-Antikörpern behandelt. Der Nachweis erfolgte mit Cy³-markiertem Sekundärantikörper. Das B4-Protein zeigt sich als Punktmuster im Zytosol verteilt.

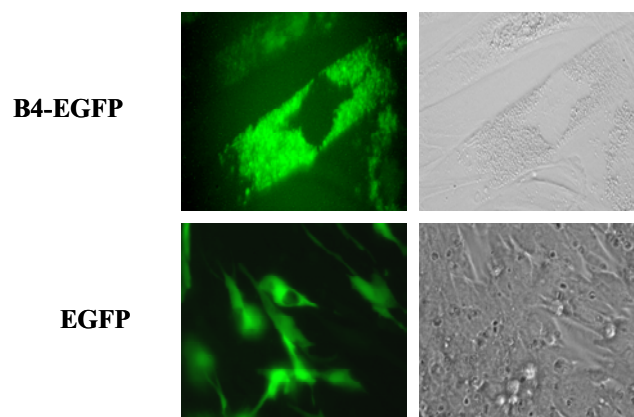


Abbildung 34b: Stabile Expression von B4-Protein in humanen 86HG39-Zellen.

Direkt Immunfluoreszenz-Analyse an stabilen Klonen von 86HG39 nach der Selektion mit (G418). Das B4-Protein zeigt sich als Punktmuster im Zytosol lokalisiert.

Nach dem Nachweis der stabilen Überexpression von B4-GFP in den Astrozytomzellen 86HG39 wurde das Wachstum der Mutanten mit dem der Wildtypzellen verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 dargestellt und zeigt, dass die Expression des B4-Proteins in den Astrozytomzellen deren Wachstum nicht beeinflusst.

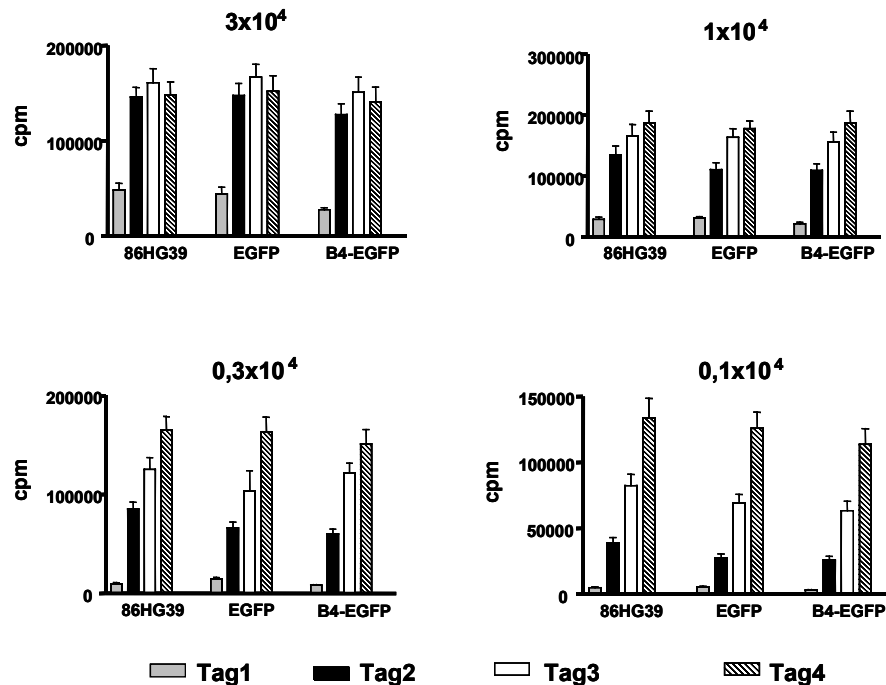


Abbildung 35: Astrozytomzellen -Proliferationstest nach Expression des B4-Proteins.

Verschiedene Mengen von 86HG39-, EGFP- und B4-EGF- Zellen wurden in 96-Well-Platten kultiviert. Jeder Ansatz wurde in vier 24-stündigen Intervallen mit ^3H -Thymidin markiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde nach insgesamt 24 Stunden Inkubation gemessen.

Damit ist es wahrscheinlich, dass die wachstumshemmende Eigenschaft einer B4 Überexpression keinen generellen antiproliferativen Effekt vermittelt.

Für die spezifische Reduktion der intrazellulären Proliferation von *T. gondii* durch die Überexpression des B4-Proteins kann es verschiedene Gründe geben. So ist z.B. bekannt, dass für das erfolgreiche Eindringen in die Wirtszelle eine exakte Ausrichtung des Parasiten an der Zelloberfläche notwendig ist. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist die Beweglichkeit der Parasiten. Andererseits könnte das überexprimierte B4-Protein das intrazelluläre Parasitenwachstum selbst beeinflussen.

III.7.3 Analyse der „gliding motility“

Für die Toxoplasmen ist die Bewegungsfähigkeit essentiell, um sich in den Wirtsorganismen vermehren zu können. *T. gondii* besitzt genau wie die übrigen Parasiten des Stammes Apicomplexa jedoch keine Cilien oder Geißeln, sondern bewegt sich durch gleitende Bewegungen auf festen Oberflächen vorwärts. Dieser Fortbewegungsprozess wird als „gliding motility“ bezeichnet (Sibley *et al.*, 1998) und wird durch den parasitären Aktin-Myosin-Motor vorangetrieben (Dobrowolski *et al.*, 1997). Während dieser gleitenden Bewegung verliert *T. gondii* durch die Reibung an den Oberflächen einen Teil seines Oberflächenproteins SAG1. Mit Hilfe eines monoklonalen Antiköpers gegen SAG1 kann das SAG1-Protein detektiert werden und so die bei der Parasitenbewegung entstehenden Spuren nachgezeichnet werden. Da die „gliding motility“ für die Wachstumsrate in Zellkulturen wichtig ist, wurde diese in Wildtyp-Parasiten RH und RH-B4-Myc Parasiten mittels Immunfluoreszenz vergleichend untersucht. Es wurde beobachtet, dass sich die Wildtyp RH Parasiten über lange Strecken fortbewegen können, die RH-B4-Myc Parasiten legen im Gegensatz dazu nur kurze Strecken zurück (Abbildung 36).

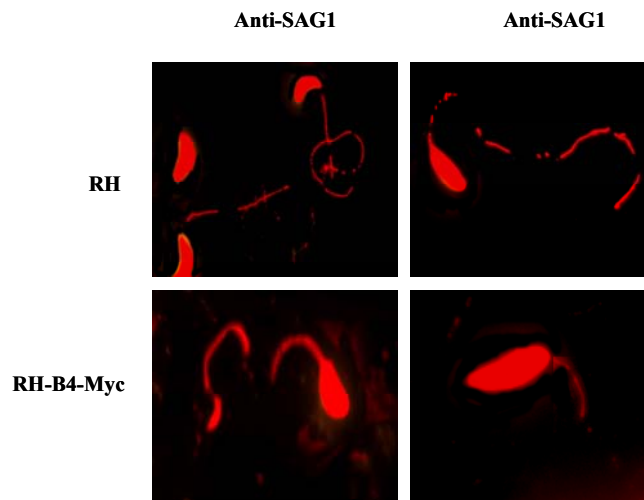


Abbildung 36: „gliding motility“- Vergleich zwischen RH und RH-B4-Myc Toxoplasmen

10^7 frisch geerntete RH bzw. RH-B4-Myc Parasiten wurden in 1 ml Medium IMDM resuspendiert und für 30 min auf Kulturplatten, die wie in II.2.9.4 beschrieben, inkubiert. Die Immunfluoreszenzenanalyse wurde mit Anti-SAG1-Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit Cy³-markiertem Sekundärantikörper. Gezeigt werden Abbildungen aus zwei verschiedenen Experimenten.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Überexpression des B4-Proteins in Toxoplasma Tachyzoiten die „gliding motility“ direkt oder indirekt reduziert. Dadurch könnte die Invasionsfähigkeit der Parasiten beeinflusst werden.

III.7.4 Die „invasion assay“-Analyse

Die Fähigkeit von *T. gondii* in Wirtszellen einzudringen, wird als "Invasion" bezeichnet und kann mittels FACS-Analysen quantitativ erfasst werden. Um diesen Prozess zu analysieren, wurden jeweils 1×10^7 86HG39-Zellen mit einem einfachen Überschuss von stabil transformierten Parasiten RH-B4-YFP oder RH-YFP-YFP (freundliche Gabe von B. Stripen, Athens, USA) infiziert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, um extrazelluläre Parasiten zu entfernen, wurden die gesamten Zellpopulationen mit Trypsin behandelt, mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und mittels FACS analysiert. Als Kontrollen wurden freie Parasiten (Abbildung 37a) und nicht infizierte Wirtszellen verwendet.

Bei den FACS-Analysen kann die Fluoreszenz der Mutanten direkt und ohne weitere Behandlungen detektiert werden. Als Positivkontrolle wurden mit RH-YFP-YFP-Mutanten infizierten Wirtszellen eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit Wildtyp RH Parasiten infiziert wurden. Die Auswertung der FACS-Daten zeigte bei der getesteten Inkubationszeit von einer Stunde keinen signifikanten Unterschied in der Invasionsfähigkeit zwischen RH-B4-YFP- und RH-YFP-YFP-Parasiten (Abbildung 37 b/c). In beiden Gruppen war nach dem Infektionszeitraum von einer Stunde ca. die Hälfte der Zellen mit Parasiten infiziert. Diese Daten wurden in mehreren weiteren, unabhängigen Experimenten bestätigt. Die mit RH-YFP-YFP infizierten Zellen fluoreszieren stärker als die mit RH-B4-YFP infizierten Zellen, da die RH-YFP-YFP-Parasiten das YFP doppelt enthalten. Die inhomogene Spitze der „peaks“ in den Histogrammen 37b und 37c bei den infizierten Wirtszellen liegt möglicherweise daran, dass nicht allen Wirtszellen mit der selben Zahl von Parasiten infiziert sind und damit eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität zeigen.

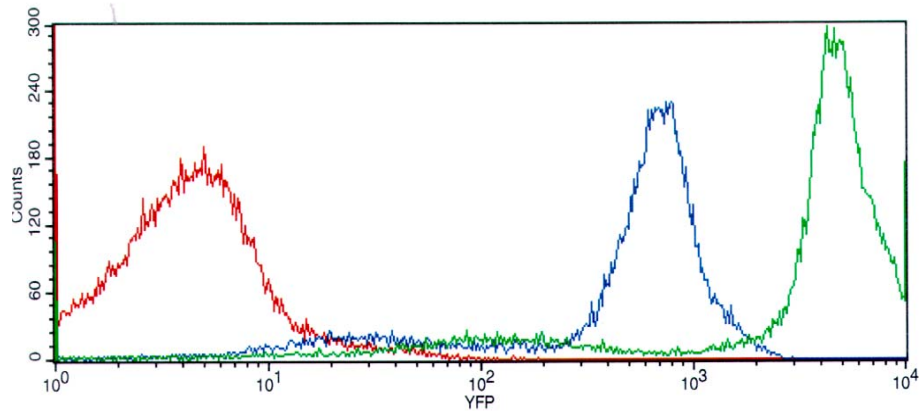


Abbildung 37a : FACS-Analyse der YFP-Expression in freien *T. gondii* Parasiten

Gezeigt ist ein Histogramm-Overlay der FACS-Ergebnisse mit freien Tachyzoiten. In Rot dargestellt ist das Signal der Negativkontrolle mit nativen RH Toxoplasmen. Das blaue Histogramm zeigt das Signal für den RH-B4-YFP Mutanten. Das grüne Histogramm zeigt das Signal der Positivkontrolle mit RH-YFP-YFP Parasiten.

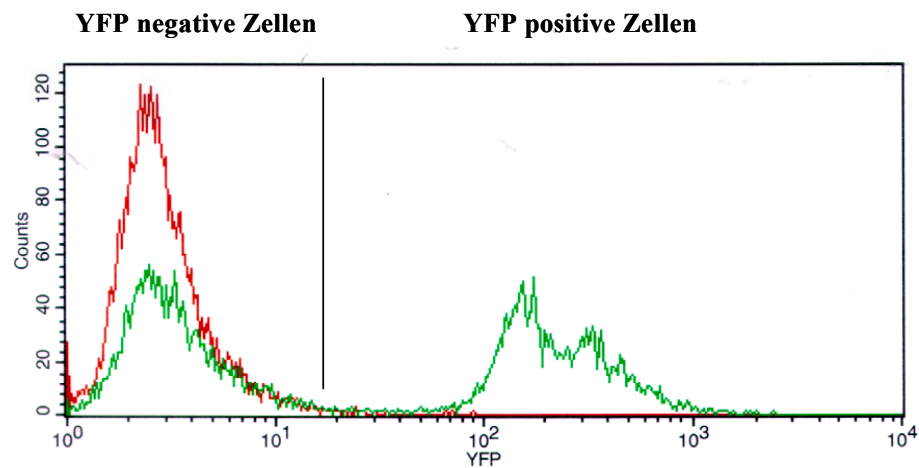


Abbildung 37b : FACS-Analyse von Astrozytomzellen nach RH-YFP-YFP Infektion

Gezeigt ist ein Histogramm-Overlay der FACS-Ergebnisse. In Rot dargestellt ist das Signal der Negativkontrolle mit nativen RH Toxoplasmen. Das grüne Histogramm zeigt das Signal für die RH-YFP-YFP-Mutanten. Die Auswertung der FACS-Daten ergab, dass 46,64 % der Zellen mit den RH-YFP-YFP-Mutanten infiziert waren.

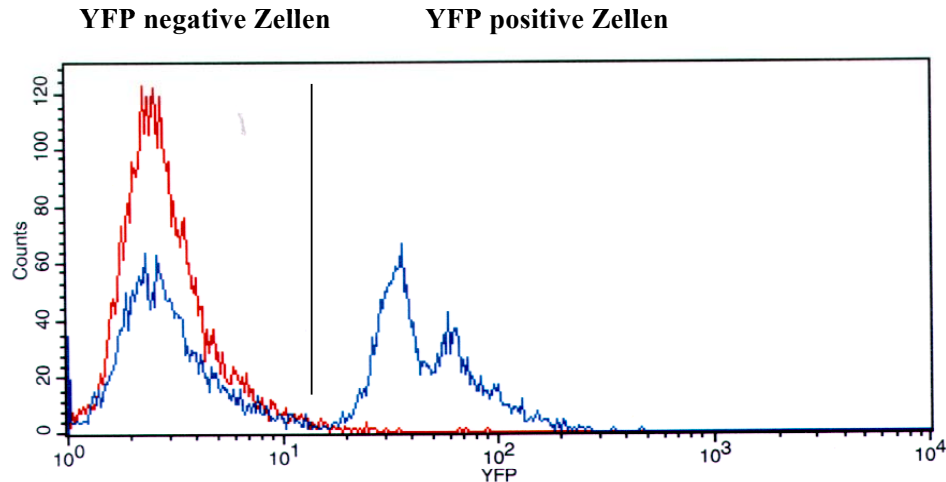


Abbildung 37c : FACS-Analyse von Astrozytomzellen nach RH-B4-YFP Infektion

Gezeigt ist ein Histogramm-Overlay der FACS-Ergebnisse. In Rot dargestellt ist das Signal der Negativkontrolle mit nativen RH Toxoplasmen. Das blaue Histogramm zeigt das Signal der RH-B4-YFP-Mutanten. Die Auswertung der FACS-Daten ergab, dass 46,25 % der Zellen mit den RH-B4-YFP-Mutanten infiziert waren.

Damit ist klar, dass trotz der reduzierten „gliding motility“ die RH-B4-Myc-Mutanten nach einer Stunde Inkubation mit Wirtszellen eine normale Invasionsfähigkeit besitzen. Die geschilderte Reduktion des Parasitenwachstums bei den B4-Mutanten RH-B4-YFP bzw. RH-B4-Myc beruht daher am wahrscheinlichsten auf einer negativen Beeinflussung des Wachstums innerhalb der parasitophoren Vakuole, d.h. während der Endodyogenie. Diese Störung ist möglicherweise auch Ursache für die oben beschriebene Entstehung von Residualkörpern.

IV. Diskussion

Die Toxoplasmose ist eine Zoonose, die durch den Parasiten *T. gondii* hervorgerufen wird. Der genaue Mechanismus der Invasion, der obligat intrazellulären Replikation und der Lyse der Wirtszelle ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Identifikation der Funktion von neuen *T. gondii* Genen könnte weitere Einblicke in diese Prozesse ermöglichen.

Um ein besseres Verständnis der Immunantwort gegen diesen Parasiten zu erhalten, wurden in den letzten zwanzig Jahren viele Toxoplasma-Antigene untersucht. Dadurch erhofft man sich, einen Impfstoff entwickeln zu können, der die Infektion und Reaktivierung verhindern oder zumindest einschränken kann. Zusätzlich soll die Definition von immundominanten Antigenen bei Toxoplasmen zu einer Verbesserung der serologischen Diagnostik führen.

Aus einer in unserer Arbeitsgruppe etablierten cDNA-Expressionsbank von *T. gondii*-Tachyzoiten konnte auf der Suche nach neuen Genen, deren Produkte vom Immunsystem erkannt werden, die provisorisch als H4, B10 und B4 bezeichneten Gene gefunden werden. Durch Abgleich mit existierenden Sequenzen konnten die Gene H4 und B10 relativ schnell charakterisiert werden. H4 wurde als Mikronemenprotein erkannt (Brydges *et al.*, 2000), während B10 als neues GRA Protein (GRA9) identifiziert wurde (Adjogble *et al.*, 2004).

Ziel dieser Arbeit war es, das B4-Gen und sein Produkt auf verschiedenen Ebenen näher zu charakterisieren und zu identifizieren. Diese Arbeiten wurden durch die Tatsache erschwert, dass die bisher vorhandenen Sequenzdaten nach Abgleich mit verschiedenen Datenbanken keinen direkten Hinweis auf die mögliche Funktion des B4-Gens und des B4-Proteins ergaben.

IV.1 Charakterisierung und Lokalisation des B4-Gens von *T. gondii*

Zu Beginn der Arbeit lag die komplette Sequenz des putativen B4-Gens vor. Es war zunächst erforderlich nachzuweisen, dass das B4-Gen tatsächlich transkribiert wird. Mittels einer B4-Sonde konnte die B4-mRNA durch Northern-Blot-Analysen aus gereinigter Toxoplasmen-mRNA eindeutig nachgewiesen werden. Das B4-Transkript aus dem Toxoplasma-Stamm RH wurde mit einer Größe von ungefähr 1,2 kb detektiert und stimmt damit mit der Größe der von der Arbeitsgruppe bereits beschriebenen B4 mRNA aus den Toxoplasmen des Stammes BK überein.

Der Nachweis der B4-mRNA gestaltete sich schwierig, bei Verwendung von Gesamt-RNA aus BK-Toxoplasmen ließ sich nur ein schwaches mRNA-Signal detektieren (Nockemann, 1998).

Erst nach Einsatz von großen Mengen gereinigter mRNA konnte das B4-Transkript eindeutig nachgewiesen werden. Daher war zu vermuten, dass die B4-mRNA nur in geringen Mengen in Toxoplasmen vorkommt. Dies wurde mittels quantitativer RT-PCR bestätigt. Es lies sich zeigen, dass das B4-Gen nicht so stark wie SAG1 oder β -Tubulin transkribiert wird, was auf eine Regulation des B4-Gens oder auf die Kontrolle durch einen schwachen Promotors hinweist.

Zu den Promotorstrukturen bei Apicomplexa-Parasiten ist bisher nur sehr wenig bekannt. Die konventionellen cis-wirkenden eukaryontischen Promotorelemente wie die TATA-Box oder das SP1-Motiv sind bisher in keiner 5'-UTR von *T. gondii*-Genen gefunden worden (Soete *et al.*, 1999). Im Bereich der Basenpaare -25 bis -31 und zwischen -63 bis -74 upstream des Transkription-Startcodons des B4-Gens konnte keine TATA-Box jedoch TA-reiche Sequenzen gefunden werden. Ähnliche TA-reiche Regionen wurde auch bei einigen *Plasmodium falciparum* Genen wie PfCAM oder PfDHFR-TS beobachtet. Es wurde aber festgestellt, dass diese Domäne keine Auswirkungen auf den Start der Transkription besitzen (Crabb and Cowman, 1996).

Bei vielen Toxoplasmengenomen übernimmt die Heptanukleotidsequenz T/AGAGACG Promotorfunktion. Dies ist z.B. für die Gene GRA1-, GRA2-, GRA5-, GRA6-, TUB1-, SAG1- oder MIC2 beschrieben (Ajioka *et al.*, 2001). Bei diesen Genen findet man die Heptanukleotidsequenz in einem Bereich von bis zu maximal 400 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt. Die Analysen der 5'-UTR Sequenzen beim B4-Gen führte zur Identifikation von zwei dieser hochkonservierten Heptanucleotidsequenzen in einem Abstand von ca. 1050 bp vor dem Transkriptionsstart. Ferner konnte mehrere CAAT Motive in den 5'-UTR Sequenzen des B4-Gens gefunden werden, die auch an der Regulation des B4-Gens beteiligt sein können.

In der Region von 275 bis 769 bp der B4 cDNA befindet sich der offene Leserahmen (ORF). Die flankierenden Nukleotide des Startkodons der Translation entsprechen an den relevanten Stellen der Kozak-Consensus-Sequenz, die Seeber (1997) für den Translationsstart bei Toxoplasma Genen bestimmt hat. Damit definieren Start und Stopkodon beim B4-Gen einen Leserahmen von 498 bp. Durch Vergleich der B4-cDNA-Sequenz mit der entsprechenden genomischen Sequenz und durch das Fehlen von Spleißstellen konnte festgestellt werden, dass das B4-Gen über kein Intron verfügt.

Für die Definition des Translationsstartes spielen neben der Kozak-Consensus-Sequenz bei Toxoplasmen auch die sogenannte „T-Stretches“ eine Rolle. In der 5'UTR der B4-cDNA befinden sich zwar Sequenzbereiche, in denen der Anteil an Thyminresten mit 34% höher ist als

im B4-Gen (12%), echte „T-Stretches“ wie z.B. beim Tubulin-Gen von *T. gondii* sind jedoch nicht nachweisbar (Nagel *et al.*, 1988).

Die durchgeführten Southern-Blot-Analysen mit genomischer DNA lassen, zusammen mit dem Vergleich der B4-cDNA-Sequenz mit den neuen Daten des *T. gondii*-Genomprojektes, auf die Existenz eines einzelnen, auf dem Chromosom X lokalisierten B4-Gens schließen. Auf dem X-Chromosom sind, neben einigen Genen, die für sekretorische Proteine kodieren, auch die Gene IMC2, TgGAP45 und das Gen für Toxofilin zu finden. Diese Gene werden später noch eingehend besprochen

IV.2 Das B4-Protein enthält eine „coiled-coil“-Domäne

Der 495 bp lange ORF des B4-Gens codiert für 165 Aminosäuren. Aus dieser Aminosäuresequenz errechnet sich ein theoretisches Molekulargewicht von 19 kDa. Der isoelektrische Punkt wurde mit 9,6 vorausgesagt und ist auf den hohen Anteil an basischen Aminosäuren zurückzuführen.

Die Proteinsequenz des identifizierten B4-Proteins gibt keinen Hinweis auf die Funktion, die das Protein im Parasiten oder in der Wirtszelle ausüben könnte. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind in der Literatur und in den Sequenz-Datenbanken keine funktionellen Angaben über B4-ähnliche Gene von Toxoplasmen oder anderen Organismen insbesondere aus der Familie der Apicomplexa zu finden. Die Datenbankanalysen für den vollständigen ORF des B4-Gens einschließlich der 3'-UTR ergeben weder auf der DNA-Ebene (blastn) noch auf der Proteinebene (blastx, tblastx) signifikante Übereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen, was darauf hinweist, dass es sich bei dem B4-Gen um ein bislang noch nicht beschriebenes Gen handelt.

Dadurch, dass bisher keine zu B4 homologen Gene, Proteine bzw. Proteinfragmente mit einer zugewiesenen Funktion identifiziert werden konnten, war es nicht möglich, gezielte Untersuchungen auf mögliche Funktionen des neuen Proteins durchzuführen. Deswegen wurde in dieser Arbeit die Proteinsequenz des B4-Proteins detailliert auf ihre strukturellen Eigenschaften und Sequenzbesonderheiten untersucht, denn oftmals bleiben funktionelle Domänen noch konserviert, obwohl die Homologie auf Sequenzebene nicht mehr nachzuweisen ist.

Die computerunterstützten Berechnungen der Sekundärstruktur ergaben beim B4-Protein einen hohen Anteil an α -helikalen Strukturen. Zusätzliche Analysen mittels des COILS- Algorithmus (Lupas *et al.*, 1991) sagen für den Bereich der Aminosäurepositionen 42 bis 73 eine superspiralisierte „coiled-coil“-Struktur voraus (Abbildung 13). Diese Strukturvoraussage wurde

allerdings nur aufgrund der Primärsequenz des B4-Proteins getroffen und ist nicht durch experimentelle Daten unterstützt. Diese Voraussage muss natürlich noch durch strukturanalytische Verfahren (z.B. Kristallstrukturaufklärung oder CD-Spektroskopie) weiter evaluiert werden.

Bei der „coiled-coil“-Struktur handelt es sich um ein weit verbreitetes Proteinfaltungsmotiv, das trotz seines relativ einfachen Strukturprinzips sehr vielfältige biologische Funktionen übernehmen kann. Die Analyse von Primärsequenzen legt nahe, dass circa 3 bis 5% aller in Polypeptidketten eingebauter Aminosäuren in der Ausbildung von „coiled-coil“-Struktur involviert sind (Wolf *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 2000). Aufgrund ihrer Fähigkeit, Interaktionsoberflächen zu vermitteln, findet sich die „coiled-coil“-Struktur in Proteinen fast aller physiologischen Systeme. Die „coiled-coil“-Struktur besteht aus zwei oder mehr α -helikalen Strukturen, die umeinander gewunden sind und eine linksgedrehte „supercoil“-Helix bilden (Cohen and Parry 1990). Die „coiled-coil“-Strukturen können Homodimere oder Heterodimere bilden, sie können zwei bis fünfsträngige Komplexe ausbilden, und sie können parallel oder antiparallel ausgerichtet sein. In der Regel zeichnet sich die Sequenz des „coiled-coil“-Motivs durch die Wiederholung eines konservierten Musters von sieben Aminosäuren (Heptade), $(a-b-c-d-e-f-g)_n$ aus. Die a und d Positionen bilden die Interaktionsfläche zwischen den Helices und bestehen in der Regel aus hydrophoben Aminosäuren („hydrophober Kern“). Die anderen Aminosäuren sind vorwiegend polar oder geladen und können inter- und intrahelikale Interaktionen ausbilden, die zur Stabilität und Spezifität der Komplexbildung beitragen (Cohen and Parry 1990). Für die Orientierung und Spezifität sind auch die Interaktionen der Randreste (e und g) von besonderer Bedeutung (Zhou *et al.*, 1994).

In wenigen Fällen finden sich „coiled-coil“-Strukturen mit einem 11-er Motiv („undecad repeat“), die eine rechtsgewundene „supercoil“-Helix bilden (Stetefeld *et al.*, 2000). Im B4-Protein als auch bei dem Aktin-bindenden Toxofilin-Protein liegt die oben beschriebene Heptade aus hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren in vier kompletten und einer verkürzten Form vor.

Strukturen wie „coiled-coil“-Helix konnten bisher in Proteinen verschiedenster Funktionsbereiche von fibrösen Strukturproteinen bis hin zu Transkriptionsfaktoren gezeigt werden und dienen häufig der Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktion (Hach *et al.*, 2000; Nusrat *et al.*, 2000). Auch Membranfusionen können durch die dynamische Ausbildung von „coiled-coil“-Struktur vermittelt werden. Ein Beispiel sind die SNARE-Proteine, deren

Interaktion zur Ausbildung von heterotetrameren „coiled-coil“-Strukturen führt (Lin and Scheller, 1997), die dann mit Proteinen in Vesikelmembranen interagieren. Ferner sind „coiled-coil“-Proteine in dynamischen Proteinumfaltungsprozessen involviert und können sogar Ionenkanäle ausbilden (Adams *et al.*, 1995).

Aufgrund der ausgeprägten „coiled-coil“-Strukturvorhersage für das B4-Protein haben wir in *T. gondii*-Datenbanken nach weiteren Proteinen, die „coiled-coil“ Strukturen beinhalten, gesucht. Dabei konnten lediglich vier Proteine gefunden werden: die Innere-Membran- Komplex-Proteine IMC1 und IMC2 (Mann and Beckers, 2001), das Toxofilin-Protein (Poupel *et al.*, 2000) und das „gliding-associated-protein“ (TgGAP45-Protein). Auffällig ist dabei, dass drei dieser Proteine (IMC2, Toxofilin, TgGAP45) ebenso wie B4 auf dem Chromosom X kodiert werden. Obwohl es zwischen den Sequenzen dieser Proteine oder zwischen den Sequenzen ihrer „coiled-coil“-Domänen keine Homologie gibt, gehören sie alle zum Zytoskelett-Komplex des Parasiten und spielen eine Rolle bei der Fortbewegung. Im Einzelnen wurden folgende funktionelle Aufgaben von „coiled-coil“ Proteinen bei *T. gondii* beschrieben:

Der Innen-Membran-Komplex (IMC) ist ein typisches Merkmal des Unterreiches der Alveolata, zu denen auch *T. gondii* gehört. Der IMC besteht aus abgeflachten Membranvesikel, die direkt unter der Plasmamembran des Parasiten liegen und zusammen mit dieser die Pellicula bilden (Ogino and Yoneda, 1966). Eine Anzahl von zytoskeletten Elementen steht in enger Assoziation zur Pellicula, z.B. Aktin, Myosin, Mikrotubuli und intermediäre Filamente (Morrisette and Sibley, 2002 a). Der Durchmesser der IMC-Vesikel bei Toxoplasmen beträgt 20 bis 100 nm und die einzelnen Vesikel sind miteinander verbunden (Radke *et al.*, 1998). Bei Plasmodium Sporozoiten dagegen besteht der IMC nur aus einem einzelnen großen abgeflachten Vesikel (Dubremetz *et al.*, 1979). Während das IMC1-Protein nur eine einzige „coiled-coil“-Region enthält, besitzt das IMC2-Protein sechs dieser Regionen. Obwohl die beiden IMC1- und IMC2-Proteine zum Zytoskelett-Komplex der Parasiten gehören, zeigen sie nur eine schwache Homologie zu den bisher beschriebenen Zytoskelett-Proteinen der meisten anderen Organismen. Bei *Babesia gibsoni* hingegen wurde ein 29 kDa Protein mit starke Homologie zum IMC1-Protein von *T. gondii* gefunden, das aber eine Zytosolische Verteilung zeigt und nicht wie das IMC1- oder IMC2-Protein entlang der Plasmamembran des Parasiten vorliegt (Fukumoto *et al.*, 2003).

Das Toxofilin-Protein ist ein erst kürzlich beschriebenes G-Aktin-Monomere-bindendes-Protein, das ursprünglich aus Toxoplasma-Extrakten auf einer G-Aktin-Affinität-Säule isoliert wurde (Poupel *et al.*, 2000). Das 27 kDa Toxofilin-Protein mit einem pI von 9,6 enthält zwei „coiled-coil“-Strukturen und zeigt keine Homologie zu schon bekannten Proteinen. Das Toxofilin-Protein wurde bis jetzt nur bei *T. gondii* gefunden. Obwohl das Toxofilin-Protein keine typische Aktin-bindende Domäne enthält, konnten Poupel *et al.* 2000 zeigen, dass das Toxofilin Protein an G-Aktin-Monomer binden kann und dadurch ihre Polymerisation verhindert. An der Polymerisation und Depolymerisation der 44 kDa großen, globulären Aktinmoleküle sind bei *T. gondii* verschiedene Aktin-assoziierte und regulatorische Proteine beteiligt. Delorme *et al.*, 2003 konnten zeigen, dass durch die Phosphorylierung bzw. durch die Dephosphorylierung von Toxofilin-Proteinen die Aktin-Polymerisation bzw. Depolymerisation reguliert werden kann. Nach Analysen mittels des „Prosite“-Programms besitzt das B4-Protein, wie auch das Toxofilin-Protein, zahlreiche Phosphorylierungsstellen (Abbildung 12). Da in der Arbeitsgruppe keine Antikörper gegen Aktin von Toxoplasmen verfügbar waren, konnte eine mögliche Interaktion von B4 mit dem Aktin der Toxoplasmen nicht weiter analysiert werden.

TgGAP45 ist ein neues 45 kDa „gliding-associated-protein“, das über das „myosin light chain“-Protein (MLC) eine enge Assoziation mit Myosin-A eingehen kann (Gaskins *et al.*, 2004; Soldati *et al.*, 2004). Die Funktion des TgGAP45-Proteins oder seiner „coiled-coil“-Struktur bei *T. gondii* wurde noch nicht identifiziert, jedoch lässt die enge Assoziation des Proteins mit Myosin-A auf eine Rolle bei der Bewegung des Parasiten schließen (Soldati *et al.*, 2004).

Im allgemeinen besteht das *T. gondii*-Zytoskelett aus gerüstartig angeordneten filamentären Strukturen, die an der polarisierten Sekretion, der Fortbewegung und der Segregation der Tochter-Zellen während der Cytokinese beteiligt sind (Morrisette and Sibley, 2002 a). Einige dieser Proteine haben, wie oben geschildert, eine oder mehrere „coiled-coil“-Strukturen. Interessanterweise haben mehr als 30% der Proteine im *Plasmodium-falciparum*-Proteom eine „coiled-coil“-Struktur und die meisten davon stehen im Zusammenhang mit dem Zytoskelett-Komplex des Parasiten oder sind an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt.

Es ist bemerkenswert, dass die Sequenz der „coiled-coil“-Struktur des B4-Proteins (Aminosäure 42-73) eine hohe Homologie (48%) zur „coiled-coil“-Region der Tropomyosin-alpha-4-Kette des Menschen aufweist. Eine gleich hohe Homologie gibt es auch zwischen der entsprechenden Region von B4 und der Tropomyosin-alpha-4-Kette vom Pferd, vom Schwein und von der Maus.

Tropomyosin ist ein kleines Aktin-bindendes-Protein, das sich seitlich an einzelne Aktinfilamente anlagert und damit eine stabilisierende Wirkung vermittelt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten zum Strukturvergleich zwischen B4 und anderen Toxoplasmenproteinen, dass viele der strukturell ähnlichen Proteine mit dem Zytoskelett-Komplex des Parasiten assoziiert sind, daher ist es möglich, dass auch das B4-Protein ähnliche Funktionen übernimmt.

IV.3 Die Expression und Lokalisation des B4-Proteins in *T. gondii*

Zur weiteren Charakterisierung des B4-Proteins wurde ein polyklonales Antiserum gegen das B4-Protein hergestellt. Dieses detektierte im Immunoblot verschiedene rekombinante B4-Fusionsproteine (B4 fusioniert mit GST, GFP, YFP oder Myc) sowie das endogene B4-Protein aus *T. gondii* Zellextrakten.

Mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte das B4-Protein durch das B4-Antiserum sowohl in freien Tachyzoiten als auch in intrazellulären Parasiten im Zytosol nachgewiesen werden (Abbildung 19 a/b). Obwohl die Analysen der B4-Sequenz mit dem Scan-Prosit-Programm ergaben, dass das B4-Protein zwischen den Aminosäuren 70 und 86 ein Motiv für das „nuclear targeting“ enthält, zeigten alle durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen, dass das B4-Protein nicht im Kern detektierbar ist.

Innerhalb des Zytoplasmas von Toxoplasmen ist das mittels Immunfluoreszenz nachweisbare B4 weitestgehend homogen verteilt, morphologisch ergeben sich insbesondere keine Hinweise auf eine Lokalisation von B4 in den bekannten sekretorischen Organellen von *T. gondii*. In der Doppelimmunfluoreszenz mit dem Mikronemen Marker-MIC2 und mit den „dense granula“ Marker-GRA2 zeigt das B4-Protein keine Koloalisation mit den „dense granula“ oder mit den Mikronemen (Abbildung 20). Eine gemeinsame Eigenschaft der sekretorischen Proteine von Toxoplasmen ist ein hydrophobes Signalpeptide am N-Terminus der Proteine, das für den Transport in die spezifischen Organellen verantwortlich ist. Dieses N-terminale Signalpeptid fehlt jedoch beim B4-Protein. Weiterhin zeigten die Immunfluoreszenzuntersuchungen, dass die parasitophore Vakuole, die reich an sekretorischen Proteinen ist, kein B4-Protein enthält.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das B4-Protein im Zytoplasma der Toxoplasmen gelagert ist und keine Assoziation zum Zellkern oder zu den sekretorischen Organellen aufweist.

Diese Lokalisation ist gut vereinbar mit der Annahme, dass es sich bei B4 um ein Protein aus dem Zytoskelett-Komplex handeln könnte.

Häufig erlaubt die Lokalisation eines Proteins an einem bestimmten Ort eine Vermutung zu seiner Funktion. Bei *T. gondii* ist dies leider nicht immer der Fall, denn es wurden z.B. Proteine wie Histon-acetylase-GCN5 im Zytosol lokalisiert, obwohl dieses seine Funktion nur im Kern vermittelt (Hettmann and Soldati, 1999). Ferner ist bekannt, dass Proteine mit identischer Funktion in verschiedenen Parasitenbereichen lokalisiert sind. So ist die Rhomboid-Protease ROM1 in den Mikronemen lokalisiert, während das funktionell identische ROM4-Protein an der Oberfläche der Plasmamembran des Parasiten lokalisiert ist. Das ROM5-Protein zeigt sich dagegen weder an den Mikronemen noch an der Oberfläche des Parasiten sondern ist nur an der posterioren Seite des Parasiten nachweisbar (Brossier *et al.*, 2005).

IV.4 Das B4-Protein wird sowohl in Tachyzoiten als auch in Bradyzoiten exprimiert

Unter dem Einfluss des Immunsystems wandeln sich die intrazellulären Tachyzoiten in sich sehr langsam vermehrende Bradyzoiten um. Diese Bradyzoiten können intrazelluläre Zysten ausbilden. Die Zysten können weit über hundert Bradyzoiten enthalten und lebenslang im Körper verbleiben. Dabei ist insbesondere das Gehirn als Zielorgan für persistierende Zysten betroffen. Die in den Zysten enthaltenen Bradyzoiten können sich nach Aufplatzen der Zyste wieder zu Tachyzoiten differenzieren, die sich bei fehlender Immunantwort ungehindert replizieren, dabei schwere Hirnläsionen verursachen und zu einer Toxoplasmenencephalitis führen (Luft and Remington, 1992; Ambroise and Pelloux, 1993; Luft *et al.*, 1993).

Lichtmikroskopisch sind die Bradyzoiten kaum von Tachyzoiten zu unterscheiden. Als ultrastrukturelles Unterscheidungsmerkmal der beiden Stadien dient beispielsweise die Lage des Zellkerns, der bei Tachyzoiten eher zentral zu finden ist, während er bei den Bradyzoiten im hinteren Zellteil lokalisiert ist. Die Bradyzoiten scheinen verstärkt auf Glykolyse zur Energiegewinnung angewiesen zu sein, wodurch sich saure Metabolite wie Lactat im Zytosol anreichern. Tachyzoiten nutzen hingegen hauptsächlich die oxidative Phosphorylierung. Einen Hauptunterschied zwischen den beiden Toxoplasmenstadien stellt das reichliche Vorhandensein von Amylopektin-haltigen Granula in Bradyzoiten dar, die in Tachyzoiten nur vereinzelt vorkommt (Dubey *et al.*, 1998). Ein weiteres wichtiges Unterscheidungskriterium von

Tachyzoiten und Bradyzoiten sind die antigenetischen Unterschied der beiden Stadien, die mit Antikörpern nachweisbar sind. Im Allgemeinen lassen sich während der Stadienkonversion differentiell exprimierte Proteine in drei Klassen unterteilen: Oberflächenstrukturen, Stressantwort und Metabolismus. Der Zytoskelett-Komplex der Parasiten wird während der Stadienkonversion kaum verändert. So konnten die meisten bisher beschriebenen zytoskelettalen Proteine von Toxoplasmen z.B. Tubulin 1 und Myosin A sowohl in Tachyzoiten als auch in Bradyzoiten gefunden werden (Delbac *et al.*, 2001).

Es war daher interessant zu untersuchen, ob das B4-Protein auch in beiden Toxoplasmenstadien nachweisbar ist. Mittels indirekter Immunfluoreszenzanalysen konnte im Rahmen dieser Arbeit belegt werden, dass das B4-Protein sowohl in Tachyzoiten als auch in Bradyzoiten exprimiert wird. Die doppelte Immunfluoreszenz-Analyse mit anti-B4- und den Bradyzoiten-spezifischen anti-4F8-Antikörpern belegen ganz deutlich diesen Befund (Abbildung 21). Dabei ist das B4-Protein innerhalb der Bradyzoiten auch im Zytosol nachweisbar. Da im Rahmen dieser Arbeit nur geringe Mengen an Toxoplasmenzysten zur Verfügung standen, konnte ein möglicher quantitativer Expressionsunterschied des B4-Proteins zwischen Tachyzoiten und Bradyzoiten nicht untersucht werden. Damit ist klar, dass es sich bei B4 nicht um ein stadienspezifisches Protein handelt und es somit den meisten bisher beschriebenen Toxoplasmenproteinen ähnelt.

IV.5 Das B4-Protein kommt als freies und als membrangebundenes Protein vor

Viele der bisher beschriebenen „coiled-coil“-Proteine sind an Protein-Protein Interaktionen beteiligt und zum Teil an Membranen gebunden. Daher wurde analysiert, ob auch das B4-Protein möglicherweise mit membranösen Strukturen assoziiert ist.

Die Befunde der Fraktionierung von Toxoplasmen mittels differentieller Zentrifugation zeigen, dass das B4-Protein zum Großteil löslich im Cytoplasma vorkommt, jedoch zum Teil auch membranassoziiert vorliegt. Als Positivkontrolle der Fraktionierung wurde hier die Verteilung der GRA1- und der SAG1-Proteine analysiert, welche, wie beschrieben, unter gleichen Bedingungen ausschließlich im Überstand (GRA1) bzw. membrangebunden (SAG1) vorliegen. Die Analyse des B4-Proteins hat gezeigt, dass dieses Protein sehr hydrophil ist. Es stellt sich daher die Frage, wie ein überwiegend hydrophiles Protein an der Membran gebunden werden kann.

Proteine können durch verschiedene Wechselwirkungen in der Membran fixiert werden. Einige werden über hydrophobe Wechselwirkungen im Innenbereich der Doppelschicht gebunden, andere interagieren mit der polaren Kopfgruppe der Lipide (z.B. durch Myristylierung).

Bei der N- Myristylierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation, bei der die gesättigte Fettsäure Myristinsäure über eine Amidbindung an einem Glycinrest kovalent an das Protein bindet. Durch die Myristinsäure erfolgt dann eine Fixierung des Proteins an den Membranen, indem sie als Verankerung in einer der beiden Phospholipid-Schichten wirkt. Obwohl das Programm „Prosite“ eine Möglichkeit der Myristylierung des B4-Proteins voraussagt, ist in dem N-Terminus der B4-Aminosäuresequenz keine typische Methionin-Glycin Reihenfolge zu finden was eine Myristylierung unwahrscheinlich macht.

Ferner wurden in der B4-Aminosäuresequenz keine hydrophoben Abschnitte gefunden, die als membranassoziierte Domänen oder als Transmembrandomänen wirken können. Die Analyse der Sekundärstruktur des B4-Proteins zeigt jedoch, wie bereits beschrieben, eine „coiled-coil“-Struktur mit einer amphiphilen α -Helix von 32 Aminosäuren (42-73), genug, um die Plasmamembran ganz zu überqueren. Die „coiled-coil“-Helix verhält sich immer amphiphil, weil sie auf einer Seite der Helix hydrophile und auf der anderen Seite hydrophobe Seitenketten aufweist (Abbildung 14). Da das B4-Protein keinen GPI-Anker oder einen hydrophoben Transmembranbereich enthält, interagiert es vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit den membranösen Strukturen. Ähnliche Interaktionen wurden bisher bereits für das Toxoplasma-GRA2-Protein gezeigt (Mercier *et al.*, 1998) und werden bei anderen wie z.B. GRA9 vermutet (Adjogble *et al.* 2004).

Ferner könnte auch das B4-Protein durch Protein-Protein-Interaktionen indirekt an der Membran gebunden sein. Ein gutes Beispiel dafür liefert das „merozoite-surface-protein“ (MSP3) des *Plasmodium falciparum* Parasiten. Das MSP3-Protein enthält keinen GPI-Anker oder eine Transmembrandomäne, kann aber durch die Protein-Protein-Interaktion mittels seiner „coiled-coil“-Regionen indirekt an der Membran gebunden sein (Ouvray *et al.*, 1994; McColl *et al.*, 1994; Pearce *et al.*, 2004).

Die Bindung des B4-Proteins an die Membran kann aber auch durch eine elektrostatische Protein-Phospholipid-Interaktion vermittelt werden, da besonders an dem C-Terminus des B4-Proteins eine große Anzahl von positiv geladenen Lysin-Residuen vorliegen. Solche Protein-

Membran-Interaktionen wurden z.B. von Scheglmann *et al.*, 2002 mit verschiedenen Proteinen von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt.

IV.6 Serologische Untersuchungen

Im Verlauf einer Toxoplasma-Infektion wird eine Antigen-spezifische Immunantwort induziert. Diese ist häufig gegen Oberflächenantigene oder gegen sekretorische Proteine gerichtet. Das Oberflächenantigen SAG1 zum Beispiel repräsentiert 5% des Gesamtproteingehaltes des Parasiten, ist damit das dominante Protein der Tachyzoiten und induziert eine starke Immunantwort. So zeigen fast alle Patienten, die mit Toxoplasma infiziert sind, Antikörper gegen das SAG1-Protein. Dabei ist auffällig, dass Antikörper gegen SAG1 erst relativ spät im Rahmen der Immunantwort gebildet werden. Zudem schützt die Immunisierung mit dem rekombinanten SAG1-Protein oder mit der für SAG1 codierenden DNA Mäuse vor einer letalen Infektion mit virulenten Toxoplasmen (Petersen *et al.*, 1998, Nielsen *et al.*, 1999).

Weitere bekannte immundominante Antigene von *T. gondii* sind die sogenannten „excreted/secreted antigens“ (ESA). Die aus den „dense granula“ stammenden GRA-Proteine sind die Hauptbestandteile der ESA. Durch DNA-Vakzinierung gegen GRA1 oder GRA7 konnte in Mäusen eine Immunantwort induziert werden, die 70 % bzw. 50 % der Tiere vor einer letalen Infektion schützte (Vercammen *et al.* 2000).

Nach den vorliegenden Daten gehört das B4-Protein weder zu den Oberflächenantigenen noch zu den sekretorischen Proteinen. Das B4-Protein gehört damit nicht zu den wichtigsten Gruppen von Antigenen, die eine Immunantwort auslösen. Trotzdem wurde das B4-Protein bei Analysen einer cDNA-Expressionsbank von *T. gondii* mittels humaner Antiseren detektiert. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit neben den molekularbiologischen Untersuchungen des B4-Gens auch die immunologische Bedeutung des B4-Proteins analysiert. Hierfür standen 34 Antiseren von chronisch und akut infizierten Patienten zur Verfügung. Die durchgeführte Western-Blot Analysen mit dem rekombinanten GST-B4-His-Protein zeigten, dass das B4-Antigen von ca. 1/3 der serumpositiven Patientenproben (10 von 34) erkannt wurde. Dabei konnte kein Zusammenhang zum Krankheitsstadium festgestellt werden; entscheidend war eher, ob der mittels Immunfluoreszenz bestimmte Antikörpertiter insgesamt hoch war.

Das B4-Protein ist im Zytosol des Parasiten lokalisiert und ist daher für Antikörper nicht erreichbar. Falls das B4-Protein eine Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts eingehen soll,

kann dies erst nach Lyse des Parasiten erfolgen. Normalerweise werden die lebenden Parasiten nach ihrer Invasion der Wirtszelle keiner Enzymaktivität ausgesetzt, weil eine Fusion der Lysosomen mit den Phagosomen verhindert wird. Nur abgestorbene oder opsonisierte Parasiten werden lysosomal abgebaut. So könnte das B4-Protein als Antigen auf der Membran der Wirtszellen MHC-gebunden präsentiert werden. Ferner ist es möglich, dass extrazellulär gelagerte Parasiten von Antikörpern und Komplement zerstört werden, wobei es dann auch zu einer Freisetzung des B4-Proteins kommt, das dann eine zelluläre Immunantwort induzieren kann.

IV.7 Funktionelle Charakterisierung des B4-Proteins bei *T. gondii*

Die Definition der Bedeutung des B4-Proteins für *T. gondii* war eines der Hauptziele dieser Arbeit. Dafür wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden B4-„knock-out“-Mutanten erzeugt, zum anderen wurden Mutanten hergestellt, die rekombinantes B4-Potein exprimieren.

IV.7.1 B4 „knock-out“-Mutanten von *T. gondii*

Die spezifische Ausschaltung von Genen („knock-out“) ist eine wichtige Methode zur Untersuchung der Gen-Funktion. Die klassische und am häufigsten benutzte Methode bei *T. gondii* basiert auf dem Mechanismus der homologen Rekombination und führt über die Rekombination von Teilen eines sog. „knock-out“-Konstruktes mit homologen Bereichen zu den flankierenden Bereichen des Ziel-Gens zu dessen Unterbrechung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die flankierenden Regionen des B4-Gens isoliert und für die Konstruktion des Zielvektors verwendet, wobei der B4-Genloкус durch das für den Selektionsmarker kodierende Gen (CAT) ausgetauscht wurde. Im Toxoplasma Genomprojekt waren die flankierenden Sequenzen des B4-Gens verfügbar. Mittels PCR konnten die flankierenden Sequenzen amplifiziert werden. Die anschließende Sequenzierung des Produktes zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit den publizierten Daten. Ausgehend von diesem Konstrukt konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich eine B4-defiziente-Mutante hergestellt werden.

Nach dem Einbringen des „knock-out“-Vektors mittels Elektroporation wurden die Parasiten in einem Selektionsmedium für ca. drei Wochen kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt waren B4-„Knock-

out“-Parasiten mittels Doppelimmunfluoreszenz mit anti-B4- und anti-SAG1- Antikörpern nur mit Anti-SAG1 Antikörper nachweisbar (Abbildung 24). Eine weitere Vermehrung der Parasiten unter Selektionsbedingungen war jedoch nicht möglich. In einer Kontrollgruppe, die nach zweiwöchiger Kultur in Chloramphenicol-haltigem Medium und ohne weiteren Selektionsdruck kultiviert worden, waren schon nach 1 Woche Kultur keine „knock-out“-Parasiten mehr nachweisbar. Auch eine Klonierung der Parasiten in Medium ohne bzw. mit Chloramphenicolzugabe führte nicht zu einer Isolation einer Reinkultur der „knock-out“-Mutante. Da selbst nach mehreren unabhängigen Transfektionen innerhalb von zwölf Monaten keine stabilen B4-„knock-out“-Klone bzw. Linien erhalten wurden, war es leider unmöglich, detaillierte phänotypische Analysen vorzunehmen. Dies führt zu der Vermutung, dass es sich bei dem B4-Gen um ein möglicherweise essentielles Gen handelt.

In der Literatur gibt es kaum Daten zu Toxoplasmen, bei denen Proteine des Zytoskeletts ausgeschaltet wurden. In einer Arbeit von Meissner *et al.*, 2002 konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des Myosin-A-Gens eine letale Mutation ist. In der Arbeitsgruppe von Tardieux *et al.*, wurde auch das oben erwähnte Toxofilin-Gen ausgeschaltet, auch hier handelt es sich um eine letale Mutation (persönliche Mitteilung, Daten noch nicht publiziert).

Weitere Untersuchungen zur Ausschaltung des B4-Gens mittels „antisense“-RNA, mittels „knock-in“-Mutanten bzw. die Etablierung von induzierbaren „knock-out“-Parasiten zur Verifizierung des letalen Phänotyps sind notwendig, konnten jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden.

IV.7.2 Funktionelle Folgen der Überexpression des B4-Proteins in Toxoplasmen

Da die zuerst angewendete Strategie der Erzeugung von B4-„knock-out“-Parasiten leider keine weitere Analyse der Funktion von B4 erlaubte, wurden alternativ Toxoplasmenmutanten erzeugt, die rekombinantes B4 exprimieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Überexpression von verschiedenen Toxoplasmenproteinen in den Parasiten starke phänotypische Effekte auslösen kann. Häufig wurde bisher eine Hemmung der Parasitenproliferation nach Expression rekombinanter Proteine beobachtet z.B. nach Überexpression von Rab6 (Stedman *et al.*, 2003) oder von Myosin B/C (Delbac *et al.*, 2001), andere Mutanten, die das GCN5 überexprimierten, waren sogar letal (Hettmann and Soldati, 2003).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die stabile Transfektion mittels der REMI-Methode („restriction enzyme mediated integration“). Dabei wird die Effizienz der Integration von Fremd-DNA in das Genom durch eine Anregung des DNA-Reparatursystems gesteigert. Hierzu erfolgt die Transformation eines zirkulären Plasmids in Anwesenheit eines Restriktionsenzym. Dieses Enzym wird zusammen mit der Plasmid-DNA von den Parasiten aufgenommen. Die Enzymkonzentration ist so eingestellt, dass während dieses Vorgangs sowohl die Plasmid-DNA linearisiert als auch die genomische DNA geschnitten wird. Daraufhin erfolgt dann die Integration des Plasmids an einer Schnittstelle im Genom. Die Integrationsstelle hängt dabei von der Sequenzspezifität des verwendeten Restriktionsenzym ab (Bölker *et al.*, 1995; Kuspa and Loomis, 1992).

Die Erzeugung von Fusionsproteinen mit dem YFP- oder dem Myc-Epitop ist bereits in vielen *T. gondii* Studien zur Analyse der Zellbiologie des Parasiten erfolgreich verwendet worden (Hu *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei stabile Parasiten-Mutanten RH-B4-YFP und RH-B4-Myc erzeugt, dabei wurde das B4-Protein am C-Terminus mit dem YFP-Protein oder mit Myc-Epitop fusioniert.

Die Expression des B4-YFP- und B4-Myc- Fusionsproteins wurde im Western-Blot mit anti-B4-Antikörpern gut nachgewiesen. Die Immunfluoreszenz-Analyse der beiden Mutanten zeigten eine zytosolische Verteilung des B4-YFP- bzw. des B4-Myc-Proteins. Damit bestätigen sich die Ergebnisse, die wir schon mit den polyklonalen Anti-B4-Antikörpern zur Lokalisation des nativen B4-Proteins erhalten haben.

Bei der Analyse der B4-Fusionsprotein produzierenden Mutanten fällt, unabhängig von der Art des Fusionspartners (Myc, GFP, YFP), die Entstehung von Residualkörpern bei der intrazellulären Vermehrung auf. Bei *T. gondii* sind in der Literatur verschiedene Formen von Residualkörpern beschrieben.

Shaw *et al.*, 2000 haben gezeigt, dass die Behandlung von *T. gondii* mit Cytochalasin D, einem Aktin-Inhibitor, neben der Hemmung der Bewegung und der Invasion des Parasiten auch die Formation der Residualkörper verursacht. Diese enthalten eindeutig verschiedene Organellen (Rhoptrien, Mikronemen, Mitochondrien, Apicoplast und ER) und unterscheiden sich damit grundsätzlich von den Residualkörpern, die bei der Überexpression des Myosin B/C-Proteins (Delbac *et al.*, 2001) oder des B4-Proteins entstehen. Die molekulare Ursache für die Entstehung von Residualkörpern ist noch unklar, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass die konstitutive

Expression des Myosin B/C-Proteins bei *Toxoplasma* einen Defekt in der korrekten Trennung der Tochterzellen verursacht. Dabei scheinen die Kernteilung und die Anordnung des Conoids bei den Tochterzellen nicht betroffen zu sein (Delbac *et al.*, 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden bei *Caenorhabditis elegans* beobachtet, in dem die Überexpression des Myosin-VI-Proteins eine asymmetrische Segregation der Tochterzelle während der Spermatogenese verursacht (Kelleher *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit gezeigten Residualkörper, die nach Expression von B4-Fusionsproteinen entstehen, entsprechen mikromorphologisch den Residualkörpern, die nach einer Überexpression des Myosin B/C Proteins nachgewiesen wurden. Die Ursache, die zur Entstehung der Residualkörper in den B4-Mutanten führt, ist unklar, jedoch könnte auch hier eine Störung der Cytokinese bei der Endodyogenie Ursache sein. Dies würde gut zu der Vermutung passen, dass es sich bei B4 um ein Protein handelt, das zum Zytoskelett-Komplex gehört.

Ein überraschender Befund, der mit MyosinB/C-Mutanten erhoben wurde, ist, dass diese Mutanten eine reduzierte Virulenz im Tierversuch aufweisen. Entsprechende *in vivo* Experimente mit B4-Mutanten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, jedoch zeigt die verminderte Replikationsrate der B4-Mutanten in der Zellkultur, dass die Expression von B4-Fusionsproteinen in Toxoplasmen die Virulenz *in vitro* beeinflusst.

IV.7.3 Die Überexpression des B4-Proteins in Toxoplasmen verursacht eine Reduktion des Parasitenwachstums *in vitro*

Die Überexpression von Genen bei *T. gondii* kann, abhängig von der Art des überexprimierten Gens zu sehr unterschiedlichen Effekten auf das Wachstum des Parasiten führen. So bewirkt die Überexpression des RAB6-Proteins eine Reduktion der Produktion von GRA-Proteinen. Ursache ist hierbei eine Störung des Transports der GRA-Proteine vom Golgi-Apparat zu den „dense granula“. Eine Überproduktion des MyosinB/C-Proteins führt ebenfalls zu einer reduzierten Parasitenproliferation, Ursache ist hierbei vermutlich ein Defekt bei der Cytokinese (Delbac *et al.*, 2001). In dieser Arbeit ist gezeigt, dass auch die Expression von B4-Fusionsproteinen (B4-Myc und B4-YFP) in *T. gondii* zu einer Reduzierung des Wachstums führt. Dieser Effekt ist B4 spezifisch, denn die Überexpression von LDH1-Fusionsproteinen hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten.

Um zu überprüfen, ob die Expression von B4-Fusionsproteinen einen allgemeiner proliferationshemmenden Effekt vermittelt, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Mutanten von humanen Zellen erzeugt, die B4-Fusionsproteine exprimieren. Das B4-Fusionsprotein ist in den humanen Zellen punktförmig im Zytosol lokalisiert. Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde auch in HeLa Zellen beschrieben, die mit einem Zytoskelett-Komplex assoziierten „coiled-coil“-Protein von Toxoplasmen (Toxofilin-Protein) transfiziert wurden (Poupel *et al.*, 2000). Laut Poupel *et al.* ähnelt dieser Phänotyp den Aktin-„stress-fibers“, einer Struktur, die man auch beobachten kann, wenn man Zellen mit niedriger Konzentration von Cytochalasin D behandelt. Obwohl das Toxofilin-Protein über keine bekannte Aktin-Bindungsstelle verfügt und keine Ähnlichkeit mit den schon bekannten Aktin-assoziierten Proteinen zeigte, konnten Poupel *et al.* 2000 durch Immunpräzipitation zeigen, dass der Phänotyp der GFP-Toxofilin transfizierten HeLa-Zellen auf einer Bindung von Toxofilin an die G-Aktin-Moleküle der HeLa-Zellen beruht. Um die funktionelle Wirkungen des B4-Proteins bei Astrozytomzellen (86HG39) zu bestimmen, wurde die Proliferation der B4-EGFP transfizierten Zellen im Vergleich zu Zellen die mit EGFP transfiziert wurden und mit nicht-transfizierten Zellen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des B4-Proteins in 86HG39-Zellen keinen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt. Das bedeutet, dass B4-Fusionsproteine kein generelles antiproliferatives Signal vermitteln, sondern dass der wachstumsinhibitorische Effekt wahrscheinlich für *T. gondii* spezifisch ist.

Für die spezifische Reduktion der intrazellulären Proliferation von *T. gondii* nach der Expression von B4-Fusionsproteinen könnte es verschiedene Ursachen geben:

- 1 eine Störung der Beweglichkeit der Parasiten („gliding-motility“) könnte zu einer Reduktion der Infektionsrate führen.
- 2 eine Störung während der Anheftung an der Zielzelle bzw. bei der Invasion könnte zu einer verminderten Infektiosität führen.
- 3 eine Störung während der Endodyogenie kann eine verminderte Proliferationsrate verursachen.

Diese drei angegebenen Hypothesen wurden im Rahmen dieser Arbeit experimentell überprüft.

IV.7.4 Die Überexpression des B4-Proteins verursacht eine Störung der „gliding motility“

Die „gliding motility“ ist eine wichtige Voraussetzung für die Invasion der Wirtszellen durch *T. gondii*, denn unbewegliche Parasiten können die Wirtszellen nicht infizieren (Shaw *et al.*, 2000). *T. gondii* besitzt, ebenso wie alle anderen Zootenformen der Apicomplexa, keine typischen Fortbewegungsorganellen wie Cilien oder Geißeln. Trotzdem können Toxoplasmen sich durch gleitende Bewegungen auf festen Oberflächen fortbewegen (Sibley *et al.*, 1998). Diese sogenannte „gliding motility“ erfolgt über die Translokation von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Toxoplasmen, den Mikronemenproteinen, welche, über den Aktin-Myosin-Motor angetrieben, eine Gleitbewegung vermitteln. Dabei hydrolysiert das Myosin-Protein ATP-Moleküle und bewegt sich mit der dabei gewonnenen Energie entlang der Aktin-Filamente. Durch die Translokation der Proteine in Richtung des posterioren Endes des Parasiten wird ein Vorwärtsschub erzeugt (Russel and Sinden, 1981; Dobrowolski *et al.*, 1997). Die Rezeptoren auf der Wirtszellmembran, an welche die Mikronemenproteine binden, sind noch nicht eindeutig identifiziert worden, wahrscheinlich sind dabei aber Heparin-Sulfat-ähnliche Moleküle und verschiedene Glykoproteine beteiligt. Das *T. gondii* Myosin-A Protein wurde an der Plasmamembran nachgewiesen, wodurch es eine ideale Position hat, um seine Funktion als Motor im Modell der gleitenden Bewegungen zu erfüllen (Hettmann *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass im schmalen Spalt zwischen innerem Membrankomplex und der Plasmamembran der Toxoplasmen Aktin in der Nähe von Myosin-A vernetzt wird. Das Aktin ist einerseits über Aldolase mit den Mikronemenproteinen und andererseits mit dem Cytoskelett verbunden sind (Abbildung 6). Die nach posterior gerichteten Myosin-A vermittelte Bewegung des Aktin-Aldolase-Mikronemenkomplexes sorgt für die Fortbewegung der Toxoplasmen. (Carruthers *et al.*, 2000; Huynh *et al.*, 2003). Die Gleitbewegung ist bei der Toxoplasma gut analysiert worden und erlaubt drei Bewegungsvarianten (Frixione *et al.*, 1996; Hakansson *et al.*, 1999):

- 1 Ein kreisförmiges Gleiten gegen den Uhrzeigersinn, wenn der sichelförmige Parasit auf der Seite liegt.
- 2 Ein aufrechtes Herumwirbeln („twirling“), wenn der Parasit mit seiner posterioren Seite zum Substrat zeigt.
- 3 Eine helikale Rotation, die zum Überbrücken größerer Distanzen benutzt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von B4-Fusionsproteinen zu einer Störung der „gliding motility“ führte. Dabei ist besonders die helikale Rotation betroffen.

So konnten festgestellt werden, dass die Wildtyp RH-Parasiten lange Strecken über einem Substrat zurücklegen können, während die Mutanten RH-B4-Myc diese Fähigkeit zum Teil verloren haben und nur kürzere Strecken zurücklegen. Dieser Befund ist nur durch eine Störung der helikalen Rotation zu erklären, welche die einzige Möglichkeit zu einer Langstreckenbewegung über einem Substrat darstellt (Morrisette and Sibley 2002 a). Störungen der „gliding motility“ wurden bereits in verschiedenen Publikationen beschrieben. So sind z.B. Jasplakinolid-behandelte Parasiten in der Lage vorwärts und rückwärts zu gleiten während Wildtyp-Parasiten sich nur vorwärts bewegen (Wetzel *et al.*, 2003). Außerdem erhöht die Jasplakinolid-Behandlung einerseits die Geschwindigkeit der „twirling“ Bewegungen andererseits verhindert diese das kreisförmige Gleiten (Wetzel *et al.*, 2003). Um die Störung der „gliding motility“ in B4-Mutanten detailliert zu untersuchen, sind weitere Untersuchungen mittels computergestützter Video-Mikroskopie nötig, die dazu erforderliche apparative Ausstattung war in der Arbeitsgruppe leider nicht vorhanden.

IV.7.5 Analyse der Invasionsfähigkeit von B4 Mutanten

Wie bereits erwähnt, ist der Erhalt der Motilität ein wichtiger Faktor bei der Invasion von Wirtszellen durch *T. gondii*. Da die Expression von B4 Fusionsproteinen die Motilität der Toxoplasmen beeinflusst, lag es nahe, die Invasionsfähigkeit der Parasiten zu analysieren.

Die Invasion der Wirtszelle durch Toxoplasma ist ein hoch spezifischer Prozess, der im wesentlichen in folgende Schritte unterteilt werden kann: Der Parasit bindet zuerst reversibel an der Oberfläche der Wirtszelle. Danach kommt es zu einer raschen Reorientierung und das apikale Ende des Parasiten wird zu der Plasmamembran der Wirtszelle hin positioniert. Zum gleichen Zeitpunkt wird der Inhalt von spezialisierten Organellen (Rhoprien und Mikronemen) freigesetzt. Schließlich wird eine Verbindung, die sog. „moving junction“ zwischen beiden Oberflächen ausgebildet und der Parasit ist nun in der Lage, in die Wirtszelle einzudringen.

Zur Analyse der Invasionsfähigkeit wurden in dieser Arbeit RH-B4-YFP Mutanten benutzt, die in unserer Arbeitsgruppe auch erfolgreich zur Analyse des Invasionsverhaltens von Toxoplasmen in reife und unreife dendritische Zellen verwendet wurde (Giese *et al.*, 2004).

Der Vergleich zwischen Mutanten, die entweder das YFP-YFP- oder das B4-YFP- Protein exprimieren zeigte, dass die Expression von B4-YFP-Fusionsprotein die Invasionsfähigkeit der Erreger nicht beeinträchtigt. Daraus kann man folgern, dass die RH-B4-Myc-Mutanten trotz der Störung der „gliding-motility“ eine normal Invasionsfähigkeit besitzt. Deswegen ist das reduzierte Wachstum der RH-B4-Myc-Mutanten am ehesten auf eine Störung der Endodyogenie bei der intrazellulären Vermehrung zurückzuführen. Diese Vermutung wird meiner Meinung nach durch die beobachtete Bildung von Residualkörpern weiter unterstützt.

Zusammenfassend ergibt sich aus den in dieser Arbeit geschilderten Daten, dass es sich bei dem B4-Protein um ein „coiled-coil“-Protein handelt, das ähnlich wie die anderen bekannten „coiled-coil“-Proteine von *T. gondii*, mit dem Zytoskelett-Komplex assoziiert ist und an der „gliding motility“ und an der Cytokinese bei der Endodyogenie eine Rolle spielt.

Zusammenfassung

T. gondii ist ein obligat intrazellulär lebendes, parasitäres Protozoon mit großer medizinischer Bedeutung. Das Ziel dieser Arbeit war, das aus *T. gondii* neu isolierte B4-Protein biochemisch und funktionell zu charakterisieren. Das B4-Gen wurde erstmals bei der Analyse einer cDNA-Expressionsbank von *T. gondii* mit Seren von Toxoplasma-infizierten Patienten gefunden. Die durchgeführten quantitativen RT-PCR- und Northern-Blot-Analysen zeigten, dass das B4-Transkript nur in geringen Mengen in *T. gondii* vorkommt. Untersuchungen der genomischen B4-Sequenz ergaben, dass es sich um ein „single copy“ Gen handelt. Das B4-Gen ist auf dem Chromosom X lokalisiert und kodiert für ein 27 kDa Protein welches keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen aufweist. Die Sekundärstrukturanalysen sagen ein α -helikales, hydrophiles Protein mit großer Neigung zur Ausbildung von „coiled-coil“-Strukturen voraus. Diese „coiled-coil“-Struktur ist bis jetzt nur bei vier zytoskelettalen Proteinen von *T. gondii* ausgeprägt, deren Genen sich ebenfalls auf Chromosom X befinden. Das Antigen B4 zeichnet sich durch eine hohe Reaktivität mit ca. 30% der Seren von chronischen und akut infizierten Patienten aus. Mit Hilfe eines Antiserums, das gegen ein Peptid aus der B4-„coiled-coil“-Sequenz generiert wurde, konnte das B4-Antigen in Toxoplasmen in Western-Blots und mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Das B4-Protein wurde im Zytoplasma von Tachyzoiten und auch in Bradyzoiten nachgewiesen. Bei Zellfraktionierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass das B4-Protein sowohl löslich im Zytosol als auch membrangebunden vorkommt. In humanen Tumorzellen konnte die Expression des *T. gondii* B4-Gens erfolgreich durchgeführt werden. Dabei erscheint das Fusionsprotein B4-GFP in Immunfluoreszenzanalysen als Punktmuster im Zytosol verteilt und ähnelt damit dem Aktin-Stress-Fiber-Phänotyp, der auch bei der Expression von Toxofillin in HeLa Zellen beobachtet wurde. Um die Funktion des B4-Proteins weiter zu analysieren wurden B4-„knock-out“-Mutanten hergestellt und charakterisiert. Diese Mutation erwies sich als letal. Bei der Analyse von B4-Fusionsprotein-produzierenden Mutanten fällt, unabhängig von der Art des Fusionspartners (Myc, GFP, YFP), sowohl die Reduktion des Parasitenwachstums als auch die Entstehung von Residualkörpern bei der intrazellulären Vermehrung auf. Die entstandenen Residualkörper ähneln phänotypisch denen, die bei der Überexpression von Myosin B/C bei *T. gondii* beschrieben sind. Ferner reduziert die Überexpression des B4-Proteins in *T. gondii* auch die Bewegungsfähigkeit des Parasiten, nicht aber dessen Invasionsfähigkeit. Die vorliegenden

Daten lassen vermuten, dass es sich bei B4 um ein cytoplasmatisches Protein handelt, welches vermutlich eine Funktion bei der Cytokinese und der Replikation von *Toxoplasma gondii* hat.

VI. Referenz

Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol.* **1990**; 144:2725-9.

Adams PD, Arkin IT, Engelman DM, Brunger AT. Computational searching and mutagenesis suggest a structure for the pentameric transmembrane domain of phospholamban. *Nat Struct Biol.* **1995**; 2:154-62.

Adjogble KD, Mercier C, Dubremetz JF, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-Delauw MF, Daubener W. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int J Parasitol.* **2004**; 34:1255-64.

Ahn HJ, Kim S, Nam HW. Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochem Biophys Res Commun.* **2005**; 331:614-20.

Ajioka JW, Boothroyd JC, Brunk BP, Hehl A, Hillier L, Manger ID, Marra M, Overton GC, Roos DS, Wan KL, Waterston R, Sibley LD. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* **1998**; 8:18-28.

Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med.* **2001**; 2001:1-19.

Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis e Sousa C, Fairlamb A, Ribeiro JM, Sher A. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol.* **2003**; 4:485-90. Epub **2003** Mar 31.

Allen ML, Dobrowolski JM, Muller H, Sibley LD, Mansour TE. Cloning and characterization of actin depolymerizing factor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* **1997**; 88:43-52. Erratum in: *Mol Biochem Parasitol* **1997**; 90:399.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **1990**; 215:403-10.

Altschul SF, Koonin EV. Iterated profile searches with PSI-BLAST--a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem Sci.* **1998**; 23:444-7. Review.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**; 25:3389-402. Review.

Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol Today.* **1993**; 9:61-3.

- Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP, Engelstoft C, Schwantje H, Ribble CS.** Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol Infect.* 1999; 122:305-15.
- Bannister LH, Mitchell GH.** The role of the cytoskeleton in *Plasmodium falciparum* merozoite biology: an electron-microscopic view. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995; 89:105-11. Review.
- Berger B, Wilson DB, Wolf E, Tonchev T, Milla M, Kim PS.** Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:8259-63.
- Bermudes D, Peck KR, Afifi MA, Beckers CJ, Joiner KA.** Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 1994; 269:29252-60.
- Black M, Seeber F, Soldati D, Kim K, Boothroyd JC.** Restriction enzyme-mediated integration elevates transformation frequency and enables co-transfection of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995; 74:55-63.
- Black MW, Boothroyd JC.** Development of a stable episomal shuttle vector for *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 1998; 273:3972-9.
- Black MW, Boothroyd JC.** Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64:607-23. Review.
- Bohne W, Gross U, Ferguson DJ, Heesemann J.** Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol Microbiol.* 1995; 16:1221-30.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U.** Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun.* 1993; 61(3):1141-5.
- Bohne W, Holpert M, Gross U.** Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology.* 1999; 20:248-54. Review.
- Bolker M, Bohnert HU, Braun KH, Gori J, Kahmann R.** Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet.* 1995; 248:547-52.
- Bonhomme A, Bouchot A, Pezzella N, Gomez J, Le Moal H, Pinon JM.** Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Rev.* 1999; 23:551-61. Review.
- Bouchot A, Millot JM, Charpentier S, Bonhomme A, Villena I, Aubert D, Pinon JM.** Membrane potential changes after infection of monocytes by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2001; 31:1114-20.
- Brecht S, Erdhart H, Soete M, Soldati D.** Genome engineering of *Toxoplasma gondii* using the site-specific recombinase Cre. *Gene.* 1999; 234:239-47.

Brossier F, Jewett TJ, Sibley LD, Urban S. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005** Mar; 102:4146-51. Epub **2005**.

Brydges SD, Sherman GD, Nockemann S, Loyens A, Daubener W, Dubremetz JF, Carruthers VB. Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. **2000**; 111:51-66.

Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. **1988**; 141:3584-91.

Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, Bos HJ. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Vet Rec*. **1991**; 129:89-93.

Carruthers VB, Sherman GD, Sibley LD. The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J Biol Chem*. **2000**; 275:14346-53.

Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*. **1999**; 31:421-8.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol*. **1997**; 73:114-23.

Carruthers VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol Int*. **1999**; 48:1-10. Review.

Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today*. **1994**; 10:293-6.

Chardes T, Bout D. Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res Immunol*. **1993**; 144:57-60. Review.

Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. **2002**; 115:3049-59.

Cohen C, Parry DA. Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins*. **1990**; 7:1-15. Review.

Couvreux J, Desmonts G, Thulliez P. Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. *J Antimicrob Chemother*. **1988**; 22:193-200.

Crabb BS, Cowman AF. Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996**; 93:7289-94.

- Dao A, Soete M, Sergeant V, Deslee D, Fortier B, Dubremetz JF.** Potential of beta-galactosidase-expressing *Toxoplasma gondii* for in situ localization and observation of rare stages of the parasite life cycle. *Parasitol Res.* **2002**; 88:69-72.
- Daubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim KS, Schroten H.** Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* **2001**; 69:6527-31.
- De Souza W.** Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol.* 2005; 123:1-18. Epub **2005**. Review.
- Delbac F, Sanger A, Neuhaus EM, Stratmann R, Ajioka JW, Toursel C, Herm-Gotz A, Tomavo S, Soldati T, Soldati D.** *Toxoplasma gondii* myosins B/C: one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J Cell Biol.* **2001**; 155:613-23.
- Delorme V, Cayla X, Faure G, Garcia A, Tardieux I.** Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on *Toxoplasma gondii* Toxofilin. *Mol Biol Cell.* **2003**; 14:1900-12. Epub 2003.
- Delorme V, Cayla X, Faure G, Garcia A, Tardieux I.** Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on *Toxoplasma gondii* Toxofilin. *Mol Biol Cell.* **2003**; 14:1900-12. Epub 2003.
- Desmonts G, Naot Y, Remington JS.** Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J Clin Microbiol.* **1981**; 14:486-91.
- Dilbeck V, Berberof M, Van Cauwenberge A, Alexandre H, Pays E.** Characterization of a coiled coil protein present in the basal body of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* **1999**; 112:4687-94.
- Dimier IH, Bout DT.** Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology.* **1998**; 94:488-95.
- Djurkovic-Djakovic O.** *Toxoplasma* infection and pathological outcome of pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* **1995**; 40:36-41.
- Dobrowolski JM, Niesman IR, Sibley LD.** Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil Cytoskeleton.* **1997**; 37:253-62.
- Dobrowolski JM, Sibley LD.** *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* **1996**; 84:933-9.
- Dobrowolski JM, Sibley LD.** *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* **1996**; 84:933-9.

Donald RG, Carter D, Ullman B, Roos DS. 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.* **1996**; 271:14010-9.

Donald RG, Roos DS. Gene knock-outs and allelic replacements in *Toxoplasma gondii*: HXGPRT as a selectable marker for hit-and-run mutagenesis. *Mol Biochem Parasitol.* **1998**; 91:295-305.

Donald RG, Roos DS. Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase locus in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* **1994**; 63:243-53.

Donald RG, Roos DS. 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.* **1993**; 90:11703-7.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* **1998**; 11:267-99. Review.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* **1998**; 11:267-99.

Dubremetz JF, Achbarou A, Bermudes D, Joiner KA. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res.* **1993**; 79:402-8.

Dubremetz JF, Elsner YY. Ultrastructural study of schizogony of *Eimeria bovis* in cell cultures. *J Protozool.* **1979**; 26:367-76.

Dubremetz JF, Torpier G. Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *J Ultrastruct Res.* **1978**; 62:94-109.

Dynan WS, Saffer JD, Lee WS, Tjian R. Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1985**; 82:4915-9.

Feagin JE. The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Mol Biochem Parasitol.* **1992**; 52:145-8.

Feagin JE. Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol.* **2000**; 30:371-90. Review.

Ferguson DJ, Hutchison WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol Res.* **1987**; 73:483-91.

Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature.* **1997**; 390:407-9.

Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Gross U, Hadding U. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol Res.* **1997**; 83:637-41.

Fourmaux MN, Achbarou A, Mercereau-Puijalon O, Biderre C, Briche I, Loyens A, Odberg-Ferragut C, Camus D, Dubremetz JF. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol Biochem Parasitol.* **1996**; 83:201-10.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* **1970**; 167:893-6.

Freyre A, Dubey JP, Smith DD, Frenkel JK. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol.* **1989**; 75:750-5.

Frixione E, Mondragon R, Meza I. Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. *Cell Motil Cytoskeleton.* **1996**; 34:152-63.

Fukumoto S, Xuan X, Inoue N, Igarashi I, Sugimoto C, Fujisaki K, Nagasawa H, Mikami T, Suzuki H. Molecular characterization of a gene encoding a 29-kDa cytoplasmic protein of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potentiality. *Mol Biochem Parasitol.* **2003**; 131:129-36.

Gaskins E, Gilk S, DeVore N, Mann T, Ward G, Beckers C. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol.* **2004**; 165:383-93.

Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* **1992**; 149:175-80.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* **1994**; 153:2533-43.

Giese A, Stuhlsatz S, Daubener W, MacKenzie CR. Inhibition of the growth of *Toxoplasma gondii* in immature human dendritic cells is dependent on the expression of TNF-alpha receptor 2. *J Immunol.* **2004**; 173:3366-74.

Goode BL, Drubin DG, Barnes G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* **2000**; 12:63-71. Review.

Gratzl R, Hayde M, Kohlhauser C, Hermon M, Burda G, Strobl W, Pollak A. Follow-up of infants with congenital toxoplasmosis detected by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **1998**; 17:853-8.

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int J Parasitol.* **1996**; 26:169-73.

Gross U, Bohne W, Soete M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Today. **1996**; 12:30-3.

Gross U, Bohne W. *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation. J Eukaryot Microbiol. **1994**; 41:10S-11S.

Gross U, Bormuth H, Gaissmaier C, Dittrich C, Krenn V, Bohne W, Ferguson DJ. Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for studying tachyzoite-bradyzoite interconversion in vivo. Clin Diagn Lab Immunol. **1995**; 2:542-8.

Gross U, Muller J, Roos T, Schrod L, Heesemann J. Possible reasons for failure of conventional tests for diagnosis of fatal congenital toxoplasmosis: report of a case diagnosed by PCR and immunoblot. Infection. **1992**; 20:149-52.

Guerardel Y, Leleu D, Coppin A, Lienard L, Slomianny C, Strecker G, Ball S, Tomavo S. Amylopectin biogenesis and characterization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, the intracellular development of which is restricted in the HepG2 cell line. Microbes Infect. **2005**; 7:41-8. Epub 2004.

Hach A, Hon T, Zhang L. The coiled coil dimerization element of the yeast transcriptional activator Hap1, a Gal4 family member, is dispensable for DNA binding but differentially affects transcriptional activation. J Biol Chem. **2000**; 275:248-54.

Hakansson S, Charron AJ, Sibley LD. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. EMBO J. **2001**; 20:3132-44.

Hakansson S, Morisaki H, Heuser J, Sibley LD. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. Mol Biol Cell. **1999**; 10:3539-47.

Heintzelman MB. Gliding motility: the molecules behind the motion. Curr Biol. 2003; 13:R57-9. Erratum in: Curr Biol. **2003**; 13(5):454.

Hepler PK, Huff CG, Sprinz H. The fine structure of the exoerythrocytic stages of *Plasmodium fallax*. J Cell Biol. **1966**; 30:333-58.

Hermentin K, Aspöck H. Higher yields and increased purity of in vitro grown *Toxoplasma gondii*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]. **1987**; 267:272-6.

Hettmann C, Herm A, Geiter A, Frank B, Schwarz E, Soldati T, Soldati D. A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. Mol Biol Cell. **2000**; 11:1385-400.

Hettmann C, Soldati D. Cloning and analysis of a *Toxoplasma gondii* histone acetyltransferase: a novel chromatin remodelling factor in Apicomplexan parasites. Nucleic Acids Res. **1999**; 27:4344-52.

Hu K, Mann T, Striepen B, Beckers CJ, Roos DS, Murray JM. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell*. **2002**; 13:593-606.

Hu K, Roos DS, Angel SO, Murray JM. Variability and heritability of cell division pathways in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. **2004**; 117:5697-705. Epub 2004.

Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO J*. **2003**; 22:2082-90.

Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. **1960**; 46:11-21.

Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*. **1990**; 249:641-6.

Joiner KA, Roos DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol*. **2002**; 157:557-63. Epub **2002**. Review.

Jura WG, Brown CG, Rowland AC. Ultrastructural characteristics of in vitro parasite-lymphocyte behaviour in invasions with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. *Vet Parasitol*. **1983**; 12:115-34.

Kasper LH. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. **1989** Mar;57(3):668-72.

Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Lindenmann, J. Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1993**; 209-213.

Kelleher JF, Mandell MA, Moulder G, Hill KL, L'Hernault SW, Barstead R, Titus MA. Myosin VI is required for asymmetric segregation of cellular components during *C. elegans* spermatogenesis. *Curr Biol*. **2000**; 10:1489-96.

Kemp DJ, Thompson JK, Walliker D, Corcoran LM. Molecular karyotype of *Plasmodium falciparum*: conserved linkage groups and expendable histidine-rich protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1987**; 84:7672-6.

Khan IA, Smith KA, Kasper LH. Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. *J Clin Invest*. **1990**; 85:1879-86.

Kim K, Soldati D, Boothroyd JC. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science*. **1993**; 262:911-4.

Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*. **2004**; 34:423-32. Review.

King CA. Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitol Today*. **1988**; 4:315-9.

- Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS.** A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. **1997**; 275:1485-9.
- Kuspa A, Loomis WF.** REMI-RFLP mapping in the *Dictyostelium* genome. *Genetics*. **1994**; 138:665-74.
- Kwok LY, Schluter D, Clayton C, Soldati D.** The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Mol Microbiol*. **2004**; 51:47-61.
- Kyte J, Doolittle RF.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. **1982**; 157:105-32.
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**; 227:680-5.
- Lauer SA, Rathod PK, Ghori N, Haldar K.** A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science*. **1997**; 276:1122-5.
- Lecordier L, Mercier C, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF.** Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol Biol Cell*. **1999**; 10:1277-87.
- Lekutis C, Ferguson DJ, Boothroyd JC.** *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol*. **2000**; 96:89-96.
- Levine ND.** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J Parasitol*. **1980**; 66:830-4.
- Li L, Brunk BP, Kissinger JC, Pape D, Tang K, Cole RH, Martin J, Wylie T, Dante M, Fogarty SJ, Howe DK, Liberator P, Diaz C, Anderson J, White M, Jerome ME, Johnson EA, Radke JA, Stoeckert CJ Jr, Waterston RH, Clifton SW, Roos DS, Sibley LD.** Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. *Genome Res*. **2003**; 13:443-54.
- Lieberman LA, Hunter CA.** The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Int Rev Immunol*. **2002**; 21:373-403. Review.
- Lin RC, Scheller RH.** Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron*. **1997 Nov**; 19(5):1087-94.
- Lourenco EV, Pereira SR, Faca VM, Coelho-Castelo AA, Mineo JR, Roque-Barreira MC, Greene LJ, Panunto-Castelo A.** *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology*. **2001**; 11:541-7.

Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, Bourland DD 3rd, Uttamchandani R, Fuhrer J, Jacobson J, et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. *N Engl J Med.* **1993**; 329:995-1000.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* **1992**; 15:211-22. Review.

Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* **1991**; 252:1162-4.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**. New York.

Mann T, Beckers C. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* **2001**; 115:257-68.

Marechal E, Azzouz N, de Macedo CS, Block MA, Feagin JE, Schwarz RT, Joyard J. Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. *Eukaryot Cell.* **2002**; 1:653-6.

McColl DJ, Silva A, Foley M, Kun JF, Favaloro JM, Thompson JK, Marshall VM, Coppel RL, Kemp DJ, Anders RF. Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* **1994**; 68:53-67.

McLeod R, Remington JS. A method to evaluate the capacity of monocytes and macrophages to inhibit multiplication of an intracellular pathogen. *J Immunol Methods.* **1979**; 27:19-29.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* **1999**; 5:607-25. Review.

Mehlhorn H. und Piekarski G. Grundriß der Parasitenkunde. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1998.

Meissner M, Schluter D, Soldati D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science.* **2002**; 298:837-40.

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

Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol.* **2005**; 35:829-49.

Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Sibley LD. The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J Cell Sci.* **1998**; 111:2171-80.

Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Sibley LD. The amphipathic alpha helices of the toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J Cell Sci.* **1998**; 111:2171-80.

Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell.* **2002**; 13:2397-409.

Mercier C, Lefebvre-Van Hende S, Garber GE, Lecordier L, Capron A, Cesbron-Delauw MF. Common cis-acting elements critical for the expression of several genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* **1996**; 21:421-8.

Messina M, Niesman I, Mercier C, Sibley LD. Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using phleomycin selection. *Gene.* **1995**; 165:213-7.

Michel R, Schupp K, Raether W, Bierther FW. Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int J Parasitol.* **1980**; 10:309-13.

Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol.* **1993**; 150:3951-64.

Mitchell PJ, Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* **1989**; 245:371-8. Review.

Mondragon R, Frixione E. Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Eukaryot Microbiol.* **1996**; 43:120-7.

Morrisette NS, Murray JM, Roos DS. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* **1997**; 110:35-42.

Morrisette NS, Roos DS. *Toxoplasma gondii*: a family of apical antigens associated with the cytoskeleton. *Exp Parasitol.* **1998**; 89:296-303.

Morrisette NS, Sibley LD. Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* **2002 b**; 115:1017-25.

Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2002**; 66: 21-38. Review.

Nagel SD, Boothroyd JC. The alpha- and beta-tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns. *Mol Biochem Parasitol.* **1988**; 29:261-73.

Nakaar V, Ngo EO, Joiner KA. Selection based on the expression of antisense hypoxanthine-xanthine-guanine-phosphoribosyltransferase RNA in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* **2000**; 110:43-51.

Nakaar V, Ngo HM, Aaronson EP, Coppens I, Stedman TT, Joiner KA. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci. **2003**; 116:2311-20.

Nakaar V, Samuel BU, Ngo EO, Joiner KA. Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. J Biol Chem. **1999**; 274:5083-7.

Newman JR, Wolf E, Kim PS. A computationally directed screen identifying interacting coiled coils from *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. **2000**; 97:13203-8.

Ngo HM, Hoppe HC, Joiner KA. Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. Trends Cell Biol. **2000**; 10:67-72. Review.

Nichols BA, Chiappino ML, Pavesio CE. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. **1994**; 80:91-8.

Nichols BA, Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. J Protozool. **1987**; 34:217-26.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng. **1997**; 10:1-6.

Nielsen HV, Lauemoller SL, Christiansen L, Buus S, Fomsgaard A, Petersen E. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. Infect Immun. **1999**; 67:6358-63.

Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, Mrsny RJ. The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. J Biol Chem. **2000**; 275:29816-22.

Oettinger CW, Oliver JC, Macon EJ. The effects of calcium carbonate as the sole phosphate binder in combination with low calcium dialysate and calcitriol therapy in chronic hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol. **1992**; 3:995-1001.

Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Lepers JP, Ralamboranto L, Tartar A, Druilhe P. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. Mem Inst Oswaldo Cruz. **1994**; 89:77-80.

Ogino N, Yoneda C. The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. Arch Ophthalmol. **1966**; 75:218-27.

Opitz C, Soldati D. The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol Microbiol. **2002**; 45:597-604. Review.

Ortega-Barria E, Boothroyd JC. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. J Biol Chem. **1999**; 274:1267-76

Parmley SF, Weiss LM, Yang S. Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol Biochem Parasitol.* **1995**; 73:253-7.

Parmley SF, Yang S, Harth G, Sibley LD, Sucharczuk A, Remington JS. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol Biochem Parasitol.* **1994**; 66:283-96.

Patel B, Young Y, Duffy K, Tanner RP, Johnson J, Holliman RE. Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. *J Med Microbiol.* **1993**; 38:286-92.

Pearce JA, Hodder AN, Anders RF. The alanine-rich heptad repeats are intact in the processed form of *Plasmodium falciparum* MSP3. *Exp Parasitol.* **2004**; 108:186-9.

Pelletier L, Stern CA, Pypaert M, Sheff D, Ngo HM, Roper N, He CY, Hu K, Toomre D, Coppens I, Roos DS, Joiner KA, Warren G. Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature.* **2002**; 418:548-52.

Petersen E, Nielsen HV, Christiansen L, Spenter J. Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* **1998**; 16:1283-9.

Petterson EK. Destruction of *Toxoplasma gondii* by HC1 solution. *Acta Pathol Microbiol Scand [B].* **1979**; 87:217-20.

Pfefferkorn ER, Guyre PM. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infect Immun.* **1984**; 44:211-6.

Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC. Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J Protozool.* **1977**; 24:449-53.

Pinon JM, Toubas D, Marx C, Mougeot G, Bonnin A, Bonhomme A, Villaume M, Foudrinier F, Lèpan H. Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* **1990**; 28:1739-43.

Poupel O, Boleti H, Axisa S, Couture-Tosi E, Tardieux I. Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol Biol Cell.* **2000**; 11:355-68.

Poupel O, Tardieux I. *Toxoplasma gondii* motility and host cell invasiveness are drastically impaired by jasplakinolide, a cyclic peptide stabilizing F-actin. *Microbes Infect.* **1999**; 1:653-62.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene.* **1992**; 111:229-33.

Radke JR, Striepen B, Guerini MN, Jerome ME, Roos DS, White MW. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* **2001**; 115:165-75.

Radke JR, White MW. A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Biochem Parasitol.* **1998**; 94:237-47.

Reichmann G, Dlugonska H, Hisczynska-Sawicka E, Fischer H. Tachyzoite-specific isoform of *Toxoplasma gondii* lactate dehydrogenase is the target antigen of a murine CD4(+) T-cell clone. *Microbes Infect.* **2001**; 3:779-87.

Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med.* **1997**; 186:1819-29.

Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell.* **1991**; 64:615-23.

Roberts F, Roberts CW, Johnson JJ, Kyle DE, Krell T, Coggins JR, Coombs GH, Milhous WK, Tzipori S, Ferguson DJ, Chakrabarti D, McLeod R. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature.* **1998**; 393:801-5. Erratum in: *Nature* **1998**; 395:801.

Roos DS, Donald RG, Morrisette NS, Moulton AL. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol.* **1994**; 45:27-63. Review.

Ruf B, Pohle HD. Therapie und Prophylaxe der Toxoplasmose bei HIV-Infektion. *AIFO* **1995**; 9 : 479-90.

Russell DG, Burns RG. The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. *J Cell Sci.* **1984**; 65:193-207.

Russell DG, Sinden RE. The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J Cell Sci.* **1981**; 50:345-59.

Saffer LD, Mercereau-Puijalon O, Dubremetz JF, Schwartzman JD. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool.* **1992**; 39:526-30.

Saffer LD, Schwartzman JD. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J Protozool.* **1991**; 38:454-60.

Schaffer AA, Aravind L, Madden TL, Shavirin S, Spouge JL, Wolf YI, Koonin EV, Altschul SF. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* **2001**; 29:2994-3005. Review.

Scheglmann D, Werner K, Eiselt G, Klinger R. Role of paired basic residues of protein C-termini in phospholipid binding. *Protein Eng.* **2002**; 15:521-8.

Schiestl RH, Petes TD. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1991**; 88:7585-9.

Schneider A, Marechal-Drouard L. Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? Trends Cell Biol. **2000**; 10:509-13. Review.

Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. Proc Natl Acad Sci U S A. **1994**; 91:509-13.

Schwartzman JD, Pfefferkorn ER. Immunofluorescent localization of myosin at the anterior pole of the coccidian, *Toxoplasma gondii*. J Protozool. **1983**; 30:657-61.

Seeber F, Boothroyd JC. 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. **1996**; 169:39-45.

Seeber F. Consensus sequence of translational initiation sites from *Toxoplasma gondii* genes. Parasitol Res. **1997**; 83:309-11.

Shaw MK, Compton HL, Roos DS, Tilney LG. Microtubules, but not actin filaments, drive daughter cell budding and cell division in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci. **2000**; 113:1241-54.

Shaw MK, Tilney LG. How individual cells develop from a syncytium: merogony in *Theileria parva* (Apicomplexa). J Cell Sci. **1992**; 101:109-23.

Shaw MK, Tilney LG. Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. Proc Natl Acad Sci U S A. **1999**; 96:9095-9.

Sheffield HG, Melton ML. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. **1968**; 54:209-26

Shirley MW, Kemp DJ, Pallister J, Prowse SJ. A molecular karyotype of *Eimeria tenella* as revealed by contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. Mol Biochem Parasitol. **1990**; 38:169-73.

Sibley LD, Boothroyd JC. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol. **1992**; 51:291-300.

Sibley LD, Hakansson S, Carruthers VB. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. Curr Biol. **1998**; 8:12-4. Review.

Sibley LD, Messina M, Niesman IR. Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. **1994**; 91:5508-12.

Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. Nature. **1985**; 315:416-9.

Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. Science. **2004**; 304:248-53. Review.

Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. Traffic. **2003**; 4:581-6. Review.

Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. J Cell Biol. **2001**; 154:95-108.

Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. J Cell Sci. **1997**; 110:2117-28.

Smith JE. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. **1995**; 25:1301-9. Review.

Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene. **1988**; 67:31-40.

Soete M, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion in vitro. Curr Top Microbiol Immunol. **1996**; 219:76-80. Review.

Soete M, Hettman C, Soldati D. The importance of reverse genetics in determining gene function in apicomplexan parasites. Parasitology. **1999**; 118:53-61. Review.

Soldati D, Boothroyd JC. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. Science. **1993**; 260:349-52.

Soldati D, Boothroyd JC. A selector of transcription initiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Mol Cell Biol. **1995**; 15:87-93.

Soldati D, Dubremetz JF, Lebrun M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. **2001**; 31:1293-302. Review.

Soldati D, Foth BJ, Cowman AF. Molecular and functional aspects of parasite invasion. Trends Parasitol. **2004**; 20:567-74. Review.

Soldati D, Kim K, Kampmeier J, Dubremetz JF, Boothroyd JC. Complementation of a *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection. Mol Biochem Parasitol. **1995**; 74:87-97.

Soldati D. The apicoplast as a potential therapeutic target in and other apicomplexan parasites. Parasitol Today. **1999**; 15:5-7.

Stedman TT, Sussmann AR, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. J Biol Chem. **2003**; 278:5433-43. Epub **2002**.

Stetefeld J, Jenny M, Schulthess T, Landwehr R, Engel J, Kammerer RA. Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat Struct Biol.* **2000**; 7:772-6.

Stokkermans TJ, Schwartzman JD, Keenan K, Morrisette NS, Tilney LG, Roos DS. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Exp Parasitol.* **1996**; 84:355-70.

Stokkermans TJ, Schwartzman JD, Keenan K, Morrisette NS, Tilney LG, Roos DS. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Exp Parasitol.* **1996**; 84:355-70.

Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.* **1989**; 159:790-4.

Takahashi EE, Rossi CL. Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* spIgA antibodies in acute toxoplasmosis. *J Clin Pathol.* **1994**; 47:1101-4.

Taylor GA, Collazo CM, Yap GS, Nguyen K, Gregorio TA, Taylor LS, Eagleson B, Secret L, Southon EA, Reid SW, Tessarollo L, Bray M, McVicar DW, Komschlies KL, Young HA, Biron CA, Sher A, Vande Woude GF. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**; 97:751-5.

Taylor GA, Feng CG, Sher A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol.* **2004**; 4:100-9. Review.

Van der Ploeg LH, Cornelissen AW, Michels PA, Borst P. Chromosome rearrangements in *Trypanosoma brucei*. *Cell.* **1984**; 39:213-21.

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

Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, Verschuere H. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect Immun.* **2000**; 68:38-45.

Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* **2000**; 5:391-405. Review.

Weiss LM, LaPlace D, Tanowitz HB, Wittner M. Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* **1992**; 166:213-5.

Wetzel DM, Hakansson S, Hu K, Roos D, Sibley LD. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol Biol Cell.* **2003**; 14:396-406.

Wolf E, Kim PS, Berger B. MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci.* **1997**; 6:1179-89.

Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. Clin Infect Dis. **1994**; 18:853-61; quiz 862. Review.

Yap G, Pesin M, Sher A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. J Immunol. **2000**; 165:628-31

Yasuda T, Yagita K, Nakamura T, Endo T. Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. **1988**; 75:107-13.

Zhou NE, Kay CM, Hodges RS. The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability. De novo designed synthetic two-stranded alpha-helical coiled-coils. J Mol Biol. **1994**; 237:500-12.

VII Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A260	Absorption bei 260 nm
A280	Absorption bei 280 nm
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	„bradyzoite antigen“
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CCR	„cystein-cystein chemokine receptor“
CD	„cluster of differentiation“
Ci	Curie
Cy ²	Cyanine
Cy ³	Idocarbocyanine
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochlorid hydrate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EST	„expressed sequence tag“
FACS	„fluorescence-activated cell sorter“
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

G 418	Geneticin
GRA	„dense granule“
GSCN	Guanidinium-Isothiocyanat
HSS	„high speed supernant“
HSP	„high speed pellet“
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IGTP	„induzierbares GTP bindendes Protein“
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IMC	„intern membran complex“
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
LDH1	Lactatdehydrogenase 1
LSS	„low speed supernant“
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
MAG	„matrix antigen“
MHC	„major histocompatibility complex“
MIC	„Micronemenprotein“
min	Minute
NK	natürliche Killer
NO	Stickstoffmonoxid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PV	parasitophore Vakuole
PVM	parasitophore Vakuole Membran
REMI	„restriction enzyme mediated integration“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROP	Rhoprienprotein

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAG	„surface antigen“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	„Sodium Saline Citrate“
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TCA	„Trichloracetic acid“
TE	Tris EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TLA	Toxoplasmalysat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

VIII. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf.

Als Erste möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Walter Däubener für die interessante Fragestellung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst für sein Interesse und seine Bereitschaft diese Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität zu vertreten.

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 Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Däubener möchte ich danken für das freundliche Klima. Ferner danke ich allen anderen Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit und den einen oder anderen guten Rat.

Frau Prof. Dr. Dominique Soldati (Genf, Schweiz) und Frau Dr. Isabelle Tardieux (Paris, Frankreich) danke ich herzlich für ihre hilfreichen Diskussionen.

Frau PD. Dr. Gaby Reichmann danke ich für die Isolierung der *T. gondii*-Zysten und für die angenehme Mitarbeit.

Herrn Prof. Dr. Boris Stripen (Athens, USA) danke ich für die Bereitstellung von RH-YFP-YFP Parasiten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Koku Zikpi Adjogble für wertvolle Tipps und für die Einführung in die Welt der Toxoplasmenforschung.

Außerdem möchte ich mich bei folgenden Damen und Herren für ihre Unterstützung herzlich bedanken: Dr. Sandra Beer, Dr. Miriam Hopfe, PD. Dr. B. Henrich, Dr. Abdelhakim Lgssiar, Dr. Mohamed Hassen, PD Dr. med. Colin R. MacKenzie und Dr. Christian Hücke.

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.

Schließlich möchte ich Sophie Ailyati-Singleton und Sheila Singleton für ihre Unterstützung und ihre Geduld bedanken.

Eidesstattliche Erklärung:

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

Düsseldorf, den 18.10.05

.....

Aziz Ailyati