

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Pfeffer

**Eignung rekombinant hergestellter *T. gondii*- Proteine zur
serologischen Diagnose einer Toxoplasmose**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Stefanie Minkus

2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med N. Klöckner

Erstgutachter: Prof. Dr. med. W. Däubener

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. S. U. Sixt

1. Zusammenfassung

Der Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist der Krankheitserreger der Toxoplasmose und vermehrt sich obligat intrazellulär. Er kann alle kernhaltigen Zellen von Warmblütern, also auch des Menschen, befallen. Da nach Invasion der Wirtszelle während des kompletten Entwicklungszyklus von *T. gondii* GRA-Proteine aus den „dense granules“ des Parasiten sezerniert werden, können diese kontinuierlich vom Immunsystem erkannt werden. Der primäre Fokus der vorliegenden Arbeit lag somit in der Synthese rekombinanter GRA-Proteine (rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5) zur Verwendung in Western Blot-Analysen.

Hierfür wurden cDNA-Konstrukte, die für die entsprechenden Proteine kodieren, in einen *E. coli*- Expressionsvektor pET32a(+) eingefügt. Nach erfolgreicher Ligation der Konstrukte pET32a(+)-GRA1-His, pET32a(+)-GRA2-His, pET32a(+)-GRA6-His, pET32a(+)-GRA7-His, pET32a(+)-GRA9-His, sowie pET32a(+)-MIC5-His wurden diese in *E. coli* DH5 α transformiert und anschließend auf Ampicillinplatten ausgestrichen. Die anwachsenden Klone wurden mittels Sequenzanalyse und Restriktionsverdau überprüft und anschließend in den *E. coli*- Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Es folgte die denaturierende Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie und anschließend deren Kontrolle via SDS-Gelelektrophorese.

Nachfolgend wurde in Western Blot-Analysen überprüft, ob diese rekombinanten Antigene zur Diagnose einer Toxoplasmose geeignet sind. Zusammenfassend konnten in Seren von Patienten mit akuter oder reaktiver Toxoplasmose (n= 35) *T. gondii*-spezifische IgG-Antikörper gegen rGRA2(96%), rGRA6(96%) und rGRA7(88%) gefunden werden.

In allen Seren von Patienten mit einer akuten oder reaktivierten Infektion (n=14) konnten spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen werden (rGRA2(61%), rGRA6(92%) rGRA7(67%)).

Spezifische IgA-Antikörper konnten in der hier vorliegenden Arbeit seltener detektiert werden (n=14) und waren gegen rGRA2(46%), rGRA6 (44%) und rGRA7 (36%) gerichtet.

In Seren von chronisch mit *T. gondii*- Infizierten konnten in 91% IgG-Antikörper gegen rGRA2 sowie rGRA6 und in 73% gegen rGRA7 und rGRA9 gefunden werden.

Die hier vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass die in der Arbeit analysierten *T. gondii*-Proteine zur Diagnose einer Toxoplasmose geeignet sind.

In zukünftigen Experimenten soll überprüft werden, ob eine Kombination dieser Antigene beispielsweise im Line-Blot-Verfahren in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann.

The parasite *Toxoplasma gondii* (*t. gondii*) is a pathogenic organism that causes toxoplasmosis and propagates obligatorily intracellularly. It can attack all core-holding cells of endotherms, as well as those of human beings. After invasion of the host cell GRA-proteins are secreted from the “dense granules” during the whole development of *t. gondii*, therefore they can be continuously recognized by the immune system. The primary focus of the presented dissertation was the production of recombinant GRA-proteins (rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 and rMIC5) and their use in western blot analysis.

Therefore cDNA-constructs, that encode for corresponding proteins, were inserted in an *E. coli*-expression vector pET32a(+). After successful ligation of the constructs pET32a(+)-GRA1-His, pET32a(+)-GRA2-His, pET32a(+)-GRA6-His, pET32a(+)-GRA7-His, pET32a(+)-GRA9-His, as well as pET32a(+)-MIC5-His they were transformed into *E. coli* DH5 α and scratched out on ampicillin agar plates. The growing clones were verified using sequence analysis and restriction enzymes and were subsequently transformed into the *E. coli*-transformation strain BL21(DE3).

Next the denaturing protein purification using affinity chromatography was done and consecutively evaluated via SDS-gel electrophoresis.

Subsequently these recombinant antigens were used in western blots to analyse their potential to be used in the diagnosis of toxoplasmosis.

In summary, *t. gondii*-specific IgG-antibodies were found in sera of patients suffering from acute or reactivated toxoplasmosis (n=35) against rGRA2(96%), rGRA6(96%) and rGRA7(88%).

With regard to the IgM-detection, there could be found IgM-antibodies in all sera of patients with an acute or reactivated infection (n=14) (rGRA2(61%), rGRA6(92%) rGRA7(67%))

In the presented doctoral thesis specific IgA-antibodies exhibited less frequent detection, and were directed against rGRA2(46%), rGRA6 (44%) and rGRA7 (36%).

Considering sera of humans chronically infected with *t. gondii* 91% IgG-antibodies were found against rGRA2 as well as rGRA6 and 73% against rGRA7 and rGRA9.

The presented doctoral thesis clarifies, that the *t. gondii*-proteins used in this dissertation are suited for the diagnosis of toxoplasmosis.

Following trials should review, if a combination of these antigens for example using a line-blot could be established in the routine clinical diagnostics

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua dest.	destilliertes Wasser
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm ²	Quadratcentimeter
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESA	„excreted secreted antigens“
g	Beschleunigungskraft [m/s ²]
GRA-	Dichte-Granula-Proteine
Proteine	
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
h	Stunde
IFT	„immunofluorescence“-Test
IgA, IgE, IgM, IgG	Immunglobulin A, E, M, G
in vitro	im Reagenzglas
ISAGA	„immunosorbent agglutination assay“
i.v.	Intravenös
kg	Kilogramm
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
min	Minute
MIC- Proteine	Mikronemen-Proteine
MJ	„moving junction“
nm	Nanometer
p.o.	per os
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolen Membran
sog.	sogenannt
sec	Sekunden
RT	Raumtemperatur
ROP- Proteine	Rhoprien-Proteine
RON- Proteine	„rhoptry neck proteins“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TgAMA1	„Toxoplasma gondii apical membrane antigen1“
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
z. Bsp.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Eignung rekombinant hergestellter <i>T. gondii</i>- Proteine zur serologischen Diagnose einer Toxoplasmose	I
1. Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
2. Einleitung	1
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> - biologische Grundlagen und Bedeutung	1
2.2 Vermehrungszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i>	1
2.3 Pathogenese der Toxoplasmose	4
2.3.1 Postnatale Toxoplasmose	4
2.3.2 Konnatale Toxoplasmose	5
2.4 Diagnose der Toxoplasmose	6
2.5 Therapie der Toxoplasmose	8
2.6 Einteilung und Virulenz von <i>T. gondii</i>	9
2.7 Immunantwort gegen <i>T. gondii</i>	10
2.7.1 Zellvermittelte Abwehr gegen <i>T. gondii</i>	10
2.7.2 Humorale Abwehr gegen <i>T. gondii</i>	11
2.8 Struktur der Tachyzoiten und Bradyzoiten.....	12
2.9 Invasion von <i>T. gondii</i> in die Wirtszelle.....	15
2.10 Die sekretorischen Organellen von <i>T. gondii</i>	16
2.10.1 Die Mikronemen	16
2.10.2 Die Rhoptrien	17
2.10.3 Die Dichten-Granula	18
2.11 Zielsetzung der Arbeit.....	21
3. Material und Methoden	24
3.1 Allgemeines	24
3.1.1 Plasmide.....	24
3.1.2 Desoxyoligonukleotide.....	24
3.1.3 Antikörper	25
3.1.4 Restriktionsenzyme für die Molekularbiologie	26
3.1.5 Sonstige Enzyme	27
3.1.6 Größenstandards	28
3.1.7 Medien und Puffer	29

3.1.8	Feinchemikalien	30
3.1.9	Sonstige Materialien und Geräte	31
3.1.10	Plastikwaren und sonstige Einwegartikel.....	33
3.1.11	Molekularbiologische Kits	33
3.1.12	Antibiotika	34
3.1.13	Zelllinien	34
3.1.14	Bakterienstämme	34
3.1.15	<i>Toxoplasma gondii</i> -Stämme.....	35
3.2	Mikrobiologische Methoden.....	35
3.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	35
3.2.2	Stammkulturen	35
3.2.3	Bestimmung der Optischen Dichte	35
3.2.4	Präparation von <i>Toxoplasma gondii</i> -Lysat	36
3.2.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	36
3.2.6	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	37
3.3	Serologische Analysen	37
3.3.1	Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IFT)	37
3.3.2	Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> IgM Capture-Test (LIAISON Toxo IgM).....	38
3.3.3	“Immunosorbent Agglutinations Assay” (TOXO-IgM-ISAGA)	38
3.4	Molekularbiologische Methoden	39
3.4.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	39
3.4.2	cDNA-Synthese	42
3.4.3	Expression und Reinigung von Proteinen als His ₆ - Fusionsproteine	42
3.4.4	Enzymatische Reaktionen	45
3.4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	46
3.4.6	Gelelektrophoretische Analysen	47
3.4.7	Proteinanalytische Methoden	50
3.4.8	Western-Blot-Analyse.....	50
3.4.9	Immunchemischer Nachweis von Proteinen.....	51
4.	Ergebnisse	54

4.1 Herstellung der rekombinanten Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9, rMIC5 mittels Insertion eines cDNA-Konstrukts in den Expressionsvektor pET32a(+)	54
4.2 Denaturierende Aufreinigung der verschiedenen Proteine mittels His ₆ -Tag über SDS-Gele	58
4.2.1 Analyse der isolierten rGRA-His ₆ - sowie des rMIC5- His ₆ -Fusionsproteine im Western-Blot.....	60
4.3 Analyse der rekombinanten Proteine als Antigene in Western-Blot-Untersuchungen unter Verwendung von Patientenseren	62
4.3.1 IgG-spezifische Western-Blot-Analysen mit seropositiven und seronegativen Patientenproben.....	64
4.3.2 Untersuchung von Patientenseren im zeitlichen Verlauf der Infektion...	65
4.4 Western-Blot-Analysen zum Nachweis eines Leihiters.....	66
4.5 Ergebnisse der IgG-Detektion von Seren mit verschiedene IFT-Titern	68
4.6 Nachweis von Toxoplasmen-Antigen spezifischen IgM- und IgA-Antikörpern	70
5. Diskussion.....	74
5.1. Serologische Verfahren zum Nachweis einer Toxoplasmose.....	74
5.2 Rekombinante Proteine in serologischen Analysen.....	75
5.2.1 Detektion spezifischer IgG-Antikörper gegen rekombinante <i>T. gondii</i> -Proteine	76
5.2.2 Verwendung von Antigenkombinationen zur Steigerung der Sensitivität der Detektion.....	84
5.2.3 Detektion spezifischer IgM- Antikörper gegen rekombinante <i>T. gondii</i> -Proteine zur Erkennung einer akuten Toxoplasmose.....	85
5.2.4 Detektion spezifischer IgA- Antikörper gegen rekombinante <i>T. gondii</i> -Proteine zur Erkennung einer akuten Toxoplasmose.....	88
5.3 Konnatale Toxoplasmose	90
5.3.1 Infektionswege einer konnatalen Toxoplasmose und Pathogenität im Rahmen einer Reinfektion	92
5.3.2 Mikro-Peptid-Array zur Differenzierung unterschiedlicher Genotypen von <i>T. gondii</i>	93

6. Literaturverzeichnis	95
7. Abbildungsverzeichnis	117
8. Tabellenverzeichnis	118
9. Danksagung	119

2. Einleitung

2.1 *Toxoplasma gondii*- biologische Grundlagen und Bedeutung

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der taxonomisch innerhalb der Protozoen (Einzeller) dem Stamm der Apicomplexa, genauer der Ordnung der Coccidien (Levine *et al.*, 1980) zugeteilt wird. Dem Stamm der Apicomplexa gehören ca. 5000 Arten wie beispielsweise die humanpathogenen Parasiten *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium spp.* (Erreger der Malaria) sowie auch tierpathogene Parasiten wie *Sarcocystis*, *Theileria* und *Neospora an.* *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) wurde erstmals 1908 von C. Nicolle und L. Manceaux aus dem Nagetier *Ctenodactylus gondi* isoliert (Nicolle und Manceaux, 1908) und erhielt seinen Namen aufgrund seiner gebogenen Form (griechisch: toxon = Bogen; plasma = Form). Erst in den späten sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts erfolgte die komplette Beschreibung des Parasiten inklusive seines Lebenszyklus (Frenkel *et al.*, 1970; Sheffield und Melton, 1968).

Apicomplexa zeichnen sich durch einen charakteristischen Apikalkomplex aus, der spezifische sekretorische Organellen wie die Mikronemen, die Rhoptrien aber auch strukturelle Elemente des Zytoskeletts wie das Conoid beinhaltet. Somit spielt der Apikalkomplex eine wesentliche Rolle bei der Anlagerung und dem Eindringen des Parasiten in die Wirtszellen (Dubey *et al.*, 1998).

Der Parasit *T. gondii* ist in der Lage alle kernhaltigen Zellen warmblütiger Tiere (Gross und Bohne, 1994) als auch des Menschen zu infizieren und vermehrt sich obligat intrazellulär. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts ist weltweit derzeit ca. ein Drittel der Bevölkerung mit *T. gondii* infiziert. In Deutschland wird von einer durchschnittlichen Durchseuchung von ca. 50 % der Bevölkerung ausgegangen. In der jungen Altersgruppe (19-28 Jahre) zeigte sich eine Seroprävalenz von 20% bei den über 50-Jährigen war in über 70 % eine Serokonversion nachweisbar. (Wilking, H. *et al.*, 2016)

2.2 Vermehrungszyklus von *Toxoplasma gondii*

Der Lebenszyklus von *T. gondii* (s. Abbildung 1) weist eine sexuelle und eine asexuelle Vermehrungsphase auf, die sich durch drei verschiedene Entwicklungsstadien des Parasiten in Form von Sporozoiten, Tachyzoiten und Bradyzoiten charakterisieren lässt.

Die sexuelle Vermehrung des Parasiten erfolgt ausschließlich im Dünndarmepithel der Hauskatze sowie allen weiteren Mitgliedern der Gattung der Felidae. Sie stellen den Endwirt des Parasiten dar. Als Zwischenwirt dienen alle warmblütigen Vertebraten einschließlich des Menschen (Lindsay *et al.*, 1991; Dubay *et al.*, 1998, Naujoks 2008).

Nimmt eine Katze Gewebezysten beispielsweise aus einem Zwischenwirt wie der Maus durch Ingestion auf, wird die Zystenwand im Magen der Katze aufgelöst und der haploide Parasit nistet sich in die Dünndarmmukosa der Katze ein. Über mehrere asexuelle Teilungsschritte differenziert sich der Parasit zu männlichen und weiblichen Gametozyten, den Mikro- und Makrogametozyten. Nach Verschmelzung der haploiden Gameten wird die gebildete diploide Oozyste nach Platzen der Darmmukosaepithelzellen mit dem Kot ausgeschieden (Mehlhorn 2012). Die als diploides Stadium von *T. gondii* vorkommenden Oozysten sind ca. 9 x 14 µm groß. Die Oozysten sind erst nach Abschluss der Sporulation infektiös und besitzen eine äußerst hohe Widerstandsfähigkeit, welche sie in feuchter Umgebung für Monate bis Jahre beibehalten. Eine Kreuzung von verschiedenen *T. gondii*-Isolaten in der Katze ist bei gleichzeitiger Infektion des Endwirts mit zwei verschiedenen *T. gondii*-Isolaten möglich (Sibley *et al.*, 1992). Hierbei kann während der sexuellen Vermehrungsphase eine Verschmelzung von Makro- und Mikrogameten der unterschiedlichen Isolate erfolgen.

Nach oraler Aufnahme der Oozysten durch den Zwischenwirt über kontaminierte Nahrung, Wasser oder Erde, werden die durch Meiose entstandenen acht Sporozoiten im Darmepithel des neuen Wirts freigesetzt. Hier differenzieren sie sich zu den sich schnell teilenden Tachyzoiten und lösen die akute Phase der Infektion aus. *T. gondii*-Tachyzoiten weisen *in vitro* einen durchschnittlichen Reproduktionszyklus von sechs bis neun Stunden auf und besitzen eine Länge von ca. 5 µm und eine Breite von 2 µm. Ihre ungeschlechtliche Vermehrung geschieht nach Invasion in die Wirtszelle innerhalb einer Membran- begrenzten Parasitophoren Vakuole bis zu einer Anhäufung von bis zu 128 Parasiten (Radke und White, 1998). Nach sieben entsprechend vollzogenen Teilungen durch Endodyogenie, wobei aus einer Mutterzelle zwei Tochterzellen innerhalb der Mutterzelle entstehen, werden die Tachyzoiten durch Platzen der Wirtszelle freigesetzt (Joiner und Dubremetz, 1993) und können durch aktives Eindringen neue Zellen infizieren (Dobrowolski und Sibley, 1996). Hierbei infizieren sie Zellen verschiedener Gewebe und können Pathologien in vielen Organen, wie im Darm, der Leber, den Lymphknoten und der Lunge verursachen (Frenkel, 1988). Die vertikale Transmission vom Uterusendometrium auf den sich entwickelnden Fötus ist ebenfalls möglich (Kaye A., 2011).

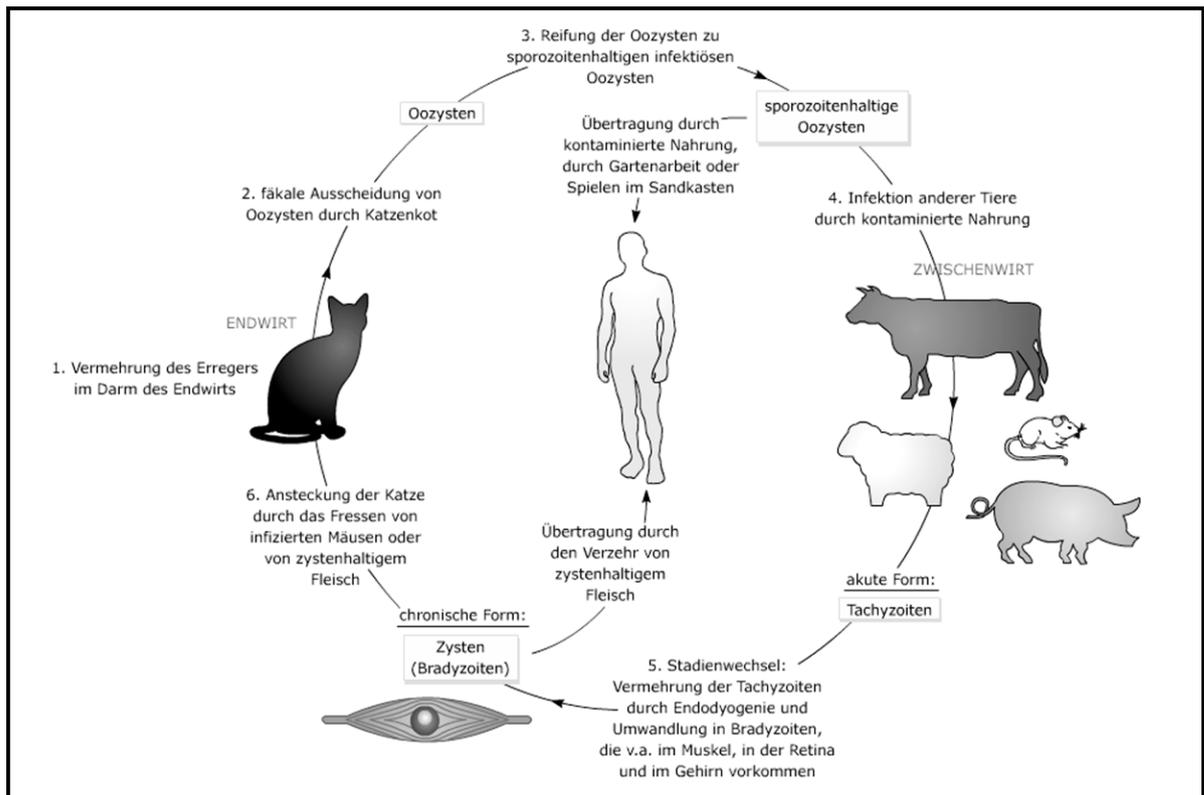


Abbildung 1: Vermehrungszyklus von *T. gondii*

T. gondii weist einen sexuellen und einen asexuellen Vermehrungszyklus auf, wobei der geschlechtliche Teil ausschließlich während der intestinalen Phase in seinem Endwirt, einem Mitglied der Familie der Felidae, stattfindet. Der asexuelle Vermehrungszyklus erfolgt in der externen Phase außerhalb des Wirtes über Sporogonie, was die Sporulation der Oozyste umfasst sowie in der extraintestinalen Phase in den Zwischen- sowie den Endwirten durch Schizogonie (Coppin *et al.*, 2003).

Um sich der Immunantwort des Wirtes zu entziehen sind die Tachyzoiten in der Lage sich zu langsam wachsenden Bradyzoiten zu differenzieren. Der Umbau wird von einem teilweisen Antigenwechsel begleitet und die Parasitophore Vakuole wird darüber hinaus zu einer Zystenhülle umgebaut. (Ferguson und Hutchinson, 1987; Dubey *et al.*, 1998). Kennzeichnend für die Bradyzoiten ist, dass sie einen stark verlangsamten Metabolismus als auch eine verminderte Replikationsrate aufweisen (Bohne *et al.*, 1999, Lyons *et al.*, 2002) und sich ebenfalls durch Endodyogenie vermehren. In diesem Entwicklungsstadium bildet der Parasit Gewebszysten der Größe von ca. 150 µm, die vorwiegend in der Muskulatur, aber auch in der Retina des Auges oder den Neuronen des Zentralen Nervensystems frühestens sieben bis zehn Tage „post infectionem“ nachgewiesen werden können. Die im immunkompetenten Wirt gebildeten Zysten können lebenslang persistieren ohne klinische Symptome auszulösen (Bohne *et al.*, 1999). Werden diese Zysten nun von einem anderen Zwischenwirt mit der Nahrung als unzureichend gegartes oder rohes Fleisch oder Fleischprodukt aufgenommen, so werden die Bradyzoiten im Magen aus der Zystenhülle freigesetzt und gelangen aufgrund ihrer Säure- und

Pepsinwiderstandsfähigkeit in den Dünndarm. Hier infizieren sie die Dünndarmepithelzellen und differenzieren sich zu Tachyzoiten (Pettersen, 1979; Jacobs *et al.*, 1960), welche nun im Zwischenwirt zu einer akuten Infektion mit anschließender chronischer Verlaufsform und Zystenbildung führen können.

2.3 Pathogenese der Toxoplasmose

Für die Infektion des Menschen mit *T. gondii* spielen vor allem zwei Infektionswege eine entscheidende Rolle:

Durch die Aufnahme von sporulierten Oozysten aus kontaminierter Nahrung durch unzureichend gewaschenes Obst und Gemüse oder durch Kontakt mit Erde im Rahmen von Gartenarbeit. Da die Oozysten von *T. gondii* sehr widerstandsfähig sind und unter geeigneten Bedingungen 18 Monate bis fünf Jahre bei 4°C überleben können, kann mit Katzenkot kontaminiertes Erdreich eine Infektionsquelle darstellen.

Eine weitere Infektionsquelle stellt die Aufnahme von rohem oder unzureichend gegartem Fleisch und Fleischprodukten dar, welche Toxoplasmenzysten enthalten können. Hierbei sind Schweinefleisch, Wild, Geflügel aber auch Fleisch von Schaf und Ziege eine wichtige Infektionsquelle. Die Zysten sind in der Lage bei 4°C so lange infektiös zu bleiben, wie das Fleisch für den Verzehr geeignet bleibt. Eine Frostung von -21°C oder aber ein 20-minütiges Erhitzen auf eine Kerntemperatur von 50°C stellen eine sichere Methode dar den Erreger abzutöten(Quelle: www.rki.de).

In Anbetracht des Zeitpunktes der Erstinfektion mit *T. gondii* unterscheidet man eine postnatale Infektion von einer pränatal (konnatal) erworbenen Toxoplasmose.

2.3.1 Postnatale Toxoplasmose

Der Hergang der postnatalen Toxoplasmose bei gesunden, immunkompetenten Personen muss deutlich vom Ablauf bei Patienten mit Immundefekten wie beispielsweise einer HIV-Infektion differenziert werden. So ist der Verlauf der Toxoplasmose stark abhängig vom Alter und Immunstatus des jeweils Betroffenen (Kayser *et al.*, 1993).

Die postnatale Infektion mit *T. gondii* zeigt meist eine klinisch milde Verlaufsform, wobei die Patienten nur in seltenen Fällen über eine schmerzlose Lymphadenopathie, Kopfschmerzen oder gar Fieber klagen, wodurch die Toxoplasmose in Ihrer Symptomatik häufig einem grippalen Infekt ähnelt. Bei Einsatz der körpereigenen Immunabwehr in der Phase der akuten Infektion kommt es zu einer Hemmung der Vermehrung des Parasiten. Dieser differenziert sich aus dem Tachyzoitenstadium in das Bradyzoitenstadium, bei dem sich Gewebszysten ausbilden, welche bevorzugt in der Muskulatur, dem Uterus, den

Neuronen des ZNS und auch der Retina des Auges persistieren können. Mit der Ausbildung der Gewebezysten geht die Infektion in das chronische, klinisch stumme Stadium über.

Bei Personen mit einer Abwehrschwäche, z. Bsp. im Rahmen einer Leukämie, nach einer Transplantation oder aber bei HIV-positiven Patienten kann eine Infektion mit *T. gondii* eine große gesundheitliche Gefährdung darstellen. Bei immunsupprimierten Patienten kann es zu einer Reaktivierung der *T. gondii* Infektion kommen. Hierbei differenzieren sich im Rahmen einer chronischen Toxoplasmose Bradyzoiten, die gelegentlich aus den Zysten ausbrechen, zu Tachyzoiten im Sinne einer Reaktivierung (Kayser *et al.*, 1993).

Bei immunkompetenten Patienten wird die *T. gondii* Infektion primär durch die zelluläre Immunabwehr des Wirtes kontrolliert, wobei Interferon- γ (IFN- γ) eine zentrale Funktion übernimmt (Subauste und Remington, 1991). Durch einen Anstieg des IFN- γ in der akuten sowie in der chronischen Phase der Infektion werden antimikrobielle Effektormechanismen in den infizierten Wirtszellen induziert, und so die Proliferation von *T. gondii* unterbunden. Sofern eine entsprechende Immunantwort nicht stattfinden kann, wie es bei Immunkompromittierten, wie z. B. AIDS-Erkrankten (McCabe und Remington, 1988; Luft und Remington, 1992), Organtransplantat-Empfängern oder Tumorpatienten (Israelski und Remington, 1993b) der Fall ist, besteht die Gefahr einer Reaktivierung der chronischen Infektion. Die Betroffenen können an einer Toxoplasmen-Enzephalitis erkranken, die in der Lage ist multiple zerebrale Läsionen zu verursachen (Wong und Remington, 1993; Ambroise-Thomas und Pelloux, 1993; Luft *et al.*, 1993). Sie geht mit Desorientiertheit, Kopfschmerzen, Krampfanfällen, Aphasien als auch motorischen Defiziten einher und kann unbehandelt zum Tod führen (Luft und Remington, 1992). Die zweithäufigste Klinik bei Reinfektion aber auch nach Reaktivierung ist die Toxoplasmen-Pneumonie. Eine Retinochorioiditis kann bei der akuten Infektion auftreten aber auch nach Reaktivierung.

2.3.2 Konnatale Toxoplasmose

Anders als eine postnatale Toxoplasmose bei immunkompetenten Personen, verläuft die pränatale Infektion meist schwerwiegender.

Infiziert sich eine schwangere Frau erstmals während der Schwangerschaft mit *T. gondii*, führt dies zu einer nachfolgenden Parasitämie, wodurch sich der Erreger in Blut und Lymphe der Schwangeren ausbreiten kann. Der Fötus kann diaplazentar mit dem Parasiten infiziert werden und kann nachfolgend schwerwiegend geschädigt werden (Villena I. *et al.*, 2010). Die Folgen einer konnatalen Toxoplasmose können von einer leichten Entwicklungsstörung über eine Retinochorioiditis (Entzündung des

Augenhintergrunds) zu geistiger Retardierung oder einem Hydrocephalus bis hin zum Abort oder einer Todgeburt führen (Sever *et al.*, 1988). 80-90% der klinisch unauffälligen Neugeborenen mit konnataler Toxoplasmose zeigten bis zum 20-sten Lebensjahr Spätschäden, die sich meist in Form einer Retinochorioiditis äußerten (Koppe *et al.*, 1986).

In aktuelleren Arbeiten wurden drei Hauptgenotypen identifiziert, die bei konnataler Toxoplasmose hauptsächlich isoliert werden konnten (Howe und Sibley, 1995). Diese unterscheiden sich in Ihrer Pathogenität gegenüber Mäusen und in Ihrem Vorkommen bei humanen Infektionen. In Europa und den USA sind derzeit die meisten Fälle der konnatalen Toxoplasmose durch den Genotyp I-III verursacht, wobei in neueren Arbeiten auch das Vorkommen atypischer Genotypen im Rahmen der pränatal erworbenen Toxoplasmose beschrieben wurde. In Südamerika finden sich weniger Infektionen, die durch Genotyp I-III verursacht sind, sondern zunehmend atypische *T. gondii* Genotypen, die teilweise fulminantere Verlaufsformen aufweisen (Lindsay und Dubay, 2011).

Während generell die Übertragungswahrscheinlichkeit einer Toxoplasmose von der Mutter auf das ungeborene Kind mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft deutlich zunimmt, nimmt jedoch die Schwere der klinisch manifesten Auswirkungen im Verlauf deutlich ab (Goldstein *et al.*, 2006). So treten die schwersten klinischen Schädigungen beim Neugeborenen nach einer Infektion im ersten Trimenon auf (Desmonts und Couvreur, 1974; Lopes, FM *et al.* 2007).

Eine Infektion mit *T. gondii* stellt somit vor allem ein Risiko für immunsupprimierte Personen und Neugeborene von Müttern, die sich erstmals während der Schwangerschaft infiziert haben, dar.

2.4 Diagnose der Toxoplasmose

Bei klinischem Verdacht einer *T. gondii* Infektion erfolgt die Diagnostik primär über den Nachweis Parasiten-spezifischer IgG- und IgM-Antikörper im Serum des Patienten. Bereits eine Woche „post infectionem“ können spezifische IgM-Ak im Blut des Betroffenen mittels „Immunosorbent-agglutination-assay“ (ISAGA) oder „IgM-Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay“ (IgM-ELISA) nachgewiesen werden (Desmonts *et al.*, 1981). Die Konzentration der IgM-Ak erreicht innerhalb von zwei bis vier Wochen ihr Maximum und sinkt anschließend im Normalfall innerhalb weniger Monate unter die Nachweisgrenze ab, allerdings können IgM-Ak auch persistieren (Takahashi *et al.*, 1997). Als weiterer Indikator einer akuten Toxoplasmose kann der Nachweis von IgA- bzw. IgE-Antikörpern herangezogen werden (Takahashi *et al.*, 1994; Pinon *et al.*, 1996). Die spezifischen IgA-Antikörper sind ca. sechs bis sieben Monate nachweisbar. Aufgrund Ihrer kurzlebigen

Kinetik können spezifische IgE-Antikörper in der Diagnostik hinzugezogen werden, um den Zeitpunkt der Erstinfektion relativ präzise datieren zu können (Piergili, 2004).

Im Gegensatz zu IgE-AK können spezifische IgG-Antikörper erst später im Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden. Sie erreichen ihr Maximum nach zwei bis vier Monaten und können danach lebenslang im Körper persistieren. Der „Sabin-Feldmann-Dye-Test“ wird in der Diagnostik als „Goldstandard“ zum Nachweis spezifischer IgG-Antikörper herangezogen. Unter Anwendung des Sabin-Feldmann-Dye-Test stellt das alleinige Vorkommen spezifischer IgG-Antikörper das Korrelat zu einer chronischen oder latenten (inaktiven) Toxoplasmose dar. Wohingegen sich eine akute Infektion sowohl durch steigende IgG-Titer als auch den Nachweis von IgM- und IgA-Antikörpern auszeichnet. Auf Basis des Antikörper-Nachweises kann eine Primärinfektion nach ein bis zwei Wochen mit serologischen Methoden erfolgreich diagnostiziert werden (Friese, 1995).

Gerade bei Schwangeren stellt die Diagnose der Toxoplasmeninfektion und deren weitere Klassifikation in akut, chronisch oder latent ein wichtiges Verfahren dar, um eine Schwangerschafts-relevante Infektion, die das Neugeborene infizieren kann, auszuschließen. Bei positivem IgG-Titer und negativem IgM-Ak-Nachweis ist von einer chronischen Infektion auszugehen, die für das Neugeborene keine Risiken beinhaltet. Eine niedrige IgG-Avidität oder der qualitative Nachweis von IgM-Antikörpern verlangt dagegen eine serologische Kontrolluntersuchung in 14 Tagen und qualitative Untersuchungen der spezifischen IgM-Antikörper (Quelle: www.rki.de, Stand 2009).

Der Nachweis einer okulären Toxoplasmose kann durch die Detektion von spezifischen IgA-Antikörpern im Augenkammerwasser erbracht werden, z.B. durch einen vergleichenden Immunoblot (Augenkammerwasser versus Serum). Ein aktives Infektionsgeschehen lässt sich jedoch in der Regel nur durch den direkten Nachweis des Parasiten oder seiner DNA bestätigen (Quelle: www.rki.de, Stand 2009).

Der direkte Erregernachweis von *T. gondii* kann mittels PCR erbracht werden und wird vor allem bei immundefizienten Patienten oder der Fragestellung der konnatalen Toxoplasmeninfektion angewandt. Die PCR stellt die schnellste und empfindlichste Nachweismethode einer *T. gondii* Infektion dar. Hierbei werden vor allem bei nicht eindeutigen serologischen Ergebnissen Blut, Liquor, Fruchtwasser oder Gewebeproben zum Nachweis der DNA von *T. gondii* in der Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt (Ailyati, A. (2005)). Auf diese Weise kann eine akute Infektion auch bei immundefizienten Personen wie HIV-Infizierten, die im Rahmen ihrer Abwehrschwäche nicht oder nur unzureichend in der Lage sind, spezifische Antikörper zu produzieren, nachgewiesen und eine frühzeitige Therapie eingeleitet werden. Eine pränatale Infektion kann durch die

Analyse von Fruchtwasser oder Nabelschnurblut nachgewiesen werden, wobei ein positiver PCR-Befund die Infektion beweist ein negativer Befund sie allerdings nicht ausschließt (Quelle: www.rki.de, Stand 2009).

2.5 Therapie der Toxoplasmose

Die Indikation zur Therapieeinleitung bei gesicherter Toxoplasmose umfasst die pränatale Toxoplasmose des Neugeborenen, die aktive Infektion bei Immunsupprimierten sowie die okkuläre Toxoplasmose. Hierbei stellen die Folsäure- sowie die Proteinsynthese des Parasiten die derzeitigen therapeutischen Angriffspunkte dar. Die Behandlung einer *T. gondii*-Infektion erfolgt nach aktuellen Empfehlungen mit einer Kombination aus Sulfonamid und Pyrimethamin (Daraprim) (Spekker, K.H., 2008) oder als Monotherapie mit dem Antibiotikum Spiramycin im 1. Trimenon der Schwangerschaft (Meyer-Wittkopf, M. 2013). Durch den Einsatz von Pyrimethamin wird eine Hemmung der Dehydrofolatreduktase bewirkt, wohingegen Sulfadiazin die Dehydrofolatsynthase blockiert (Gross, U. 2004). Da Folsäure im menschlichen Organismus eine entscheidende Rolle bei der DNA-Synthese spielt und ein Mangel zu einer megaloblastären Anämie führt, wird bei der Therapie mit Sulfadiazin und Pyrimethamin Folsäure als Supplement ergänzt. Ein Folsäuremangel birgt im Rahmen der Schwangerschaft für das Neugeborene die Gefahr des Neuralrohrdefekts, weshalb bis zur 16. Schwangerschaftswoche die Gabe von Spiramycin empfohlen wird. Dieses Makrolidantibiotikum hemmt durch seine Bindung an die 50S-Untereinheit prokaryontischer Ribosomen die Proteinsynthese des Erregers und die vertikale Transmission auf das Ungeborene kann dadurch aufgehalten werden. So kann Spiramycin bei negativem Erregernachweis mittels PCR trotz schlechter Plazentagängigkeit als Monotherapie bis zur Entbindung eingesetzt werden (Gratzl *et al.*, 2002). Bei Nachweis einer Schädigung oder Infektion des Fötus wird allerdings eine Triple-Therapie mit Pyrimethamin, Sulfadiazin und Folsäure in vierwöchigen Zyklen, die von vierwöchigen Therapie-freien Intervallen oder aber einer Spiramycin-Monotherapie unterbrochen werden, bis zum Ende der Schwangerschaft fortgeführt. Hierbei ermöglicht die hohe Lipophilie des Pyrimethamins eine gute ZNS-Gängigkeit. International gibt es allerdings keine Evidenz dafür, dass Spiramycin und Pyrimethamin die beste Therapie darstellen, so sind in anderen Ländern auch andere Behandlungsschemata vorhanden. Bei immunsupprimierten Patienten ist das Standardregime zur Behandlung einer akuten, reaktivierten Infektion mit *T. gondii* die Gabe von Pyrimethamin und Sulfadiazin. Bei bekannter Sulfonamidunverträglichkeit kann stattdessen das Lincosamidantibiotikum Clindamycin, welches die Proteinsynthese des Parasiten hemmt, eingesetzt werden. Zur Prophylaxe einer zerebralen Toxoplasmose vor allem bei einer Zahl von <200 T-

Helferzellen/ μ l Blut ist eine Prophylaxe mit hochdosiertem Cotrimoxazol zur Vermeidung einer Reaktivierung sinnvoll. In den vergangenen Jahren wurden Substanzen gefunden, die als Monotherapeutikum oder auch in Kombination mit Pyrimethamin Wirksamkeit gegen Toxoplasmen zeigten. Trotz aller verfügbaren Therapiemöglichkeiten ist bisher eine vollständige Eliminierung aller Toxoplasmenstadien nicht gelungen, da die verschiedensten chemotherapeutischen Ansätze nur gegen das Tachyzoitenstadium und nicht gegen das Bradyzoitenstadium wirksam sind (Pohl, F. U., 2002)

Darüber hinaus ist es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gelungen einen geeigneten Impfstoff zu entwickeln, der Menschen vor einer Infektion mit *T. gondii* schützt.

2.6 Einteilung und Virulenz von *T. gondii*

T. gondii ist in der Lage jede eukaryontische Zelle zu infizieren und sich intrazellulär zu vermehren. In vielen tierischen oder menschlichen Isolaten von infizierten Lebewesen konnten unterschiedliche *T. gondii* Stämme gefunden werden. Die Stämme wurden anhand ihrer Virulenz in der Maus in drei klonale Linien unterteilt: Typ I, Typ II, Typ III und kommen vor allem in Nordamerika und Europa vor (Herrmann, D. C., 2012). So werden die *T. gondii* Stämme RH und BK den *T. gondii* Typ I-Stämmen zugeordnet, welche hoch virulent sind und in der Maus zu einer tödlichen Infektion führen. Hierbei genügt ein einzelner Tachyzoit als letale Dosis. Im Rahmen der tierischen Toxoplasmose sind Infektionen mit einem Typ I-Stamm relativ selten zu finden. Hoch virulente Typ I Isolate werden dagegen mit zunehmender Häufigkeit in Verbindung mit der humanen, okkulären und konnatalen Toxoplasmose identifiziert (Johnsen, J., 2012). Ebenso werden Typ I-Stämme bei immunkompromittierten Personen wie HIV-Patienten im Rahmen einer reaktivierten Toxoplasmose isoliert (Khan *et al.*, 2005). Bei Tieren, die als Zwischenwirt für *T. gondii* dienen und auch Teil der menschlichen Nahrungskette sind, wie auch bei der humanen chronischen Toxoplasmose finden sich besonders häufig Typ II-Isolate (Howe *et al.*, 1995). In Südamerika und Asien existieren neben den drei bekannten klonalen Linien I-III auch atypische und andere Genotypen, diese zeigen im Mausmodell meist eine hohe Virulenz. Durch die zunehmende Mobilität der Weltbevölkerung weisen die atypischen Genotypen eine zunehmende Bedeutung auf. Bislang sind alle Virulenzanalysen im Mausmodell erfolgt, so dass eine gewisse Virulenz eines bestimmten Stammes auf den Menschen nicht übertragbar erscheint (Herrmann, D. C., 2012).

2.7 Immunantwort gegen *T. gondii*

Um die obligat intrazelluläre Vermehrung von *T. gondii* zu kontrollieren, spielt sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität eine wichtige Rolle (Liebermann *et al.*, 2002), wobei der Parasit durch seine intrazelluläre Lebensweise der humoralen Abwehr nur eingeschränkt zugänglich ist.

2.7.1 Zellvermittelte Abwehr gegen *T. gondii*

Zu Beginn einer Primärinfektion werden zunächst die unspezifischen, zellulären Abwehrmechanismen der angeborenen Immunabwehr aktiviert. Hierbei begrenzen phagozytierende Zelltypen wie Dendritische Zellen oder Makrophagen die Ausbreitung des Parasiten und fungieren auch als Antigen-präsentierende Zellen, wodurch sie die spezifische Immunantwort einleiten. Im Rahmen einer oralen Aufnahme von Zystenhaltigem Fleisch oder Fleischprodukten, kommt der Parasit im Dünndarm in Kontakt mit Makrophagen und Dendritischen Zellen, die sich in den Peyerschen Plaques befinden (Liesenfeld, 1999). Diese werden sowohl durch eine Infektion mit Toxoplasmen als auch durch Kontakt mit löslichen *T. gondii*-Extrakten zur Sekretion des Zytokins Interleukin-12 (IL-12) angeregt (Mashayekhi *et al.*, 2011). Bei der Auslösung zellulärer Immunreaktionen spielt IL-12 die Rolle des Schlüsselmediators. Auch Makrophagen sezernieren nach Interaktion mit *T. gondii* oder dessen Proteinen IL-12. Darüber hinaus sezernieren aktivierte Makrophagen andere Mediatoren, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die synergistisch mit IL-12 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktivieren. Diese sezernieren folglich Interferon- γ (IFN- γ), welches in Makrophagen unterschiedliche zytotoxische und zytostatische Effektormechanismen aktiviert (Melo *et al.*, 2011). Desweiteren verstärkt IL-12 die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und dadurch die Antigenpräsentation der Makrophagen und Dendritischen Zellen (Robert-Gangneux *et al.*, 2012). Durch INF- γ wird in humanen und murinen Makrophagen der oxidative Metabolismus stimuliert, wobei reaktive Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikale gebildet werden. Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen wirken anti-parasitär, wobei sich *T. gondii* durch Radikal-neutralisierende Enzyme sogenannte „scavenger“-Moleküle, wie z. Bsp. der Superoxiddismutase, der Katalase sowie der Gluthation-Peroxidase dem oxidativen Stress teilweise entziehen kann (Ding *et al.*, 2005). Desweiteren induziert INF- γ in mehreren humanen Zelltypen wie Astrozyten, Monozyten und Fibroblasten den Abbau der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan durch das Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO), wodurch das intrazelluläre Wachstum von *T. gondii* gehemmt wird (Däubener *et al.*, 2001). In murinen Makrophagen wird aus L-Arginin die

Synthese von Stickstoffmonoxid durch die induzierbare NO-Synthase als bedeutender mikrobieller Effektormechanismus genutzt. Hierbei können z. Bsp. TNF- α , IL-1, INF- γ und auch Lipopolysaccharide die NO-Synthase induzieren, welche neben dem antiparasitären Effekt auch einen immunregulatorischen Effekt durch Hemmung der T-Zellproliferation zeigt. Trotz der genannten, essentiellen Effektormechanismen ist erst die spezifische Immunantwort in der Lage die Infektion zu kontrollieren. Hierbei werden T-Zellen durch professionelle, antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen und Dendritische Zellen, die Toxoplasmen-Antigene präsentieren, in den regionären Lymphknoten stimuliert. Diese T-Lymphozyten stimulieren ihrerseits wiederum B-Lymphozyten worauf die antigenspezifische Immunantwort nach ca. fünf Tagen wirksam wird. Unter dem Einfluss von IL-12 und INF- γ wird eine Typ1-Immunantwort induziert, die für die Abwehr intrazellulärer Erreger typisch ist. Die zentrale Bedeutung der T-Zellen im Rahmen der Immunabwehr konnte durch den Transfer Toxoplasmen-spezifischer T-Lymphozyten auf suszeptible Mäuse verdeutlicht werden. Durch die Übertragung von *T. gondii* spezifischen T-Lymphozyten waren die Tiere vor einer letalen Infektion mit *T. gondii* geschützt. Während CD8-positive T-Zellen als Haupteffektorzellen fungieren, wird den CD4-positiven T-Zellen eine eher regulatorische Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der spezifischen Immunabwehr zugerechnet (Gigley *et al.*, 2011). Beide T-Zell-Populationen zeigen eine über MHC-Restriktion geregelte zytolytische Aktivität gegenüber mit *T. gondii* infizierten Wirtszellen, wobei die frei werdenden Toxoplasmen vital sind und neue Wirtszellen infizieren können. Durch CD8-positive Lymphozyten ist darüber hinaus eine MHC-unabhängige Lyse extrazellulärer Tachyzoiten möglich. Wobei die Sekretion von Zytokinen, vor allem INF- γ , den wohl entscheidendsten Teil der T-Zell-vermittelten Immunabwehr darstellt (Däubener *et al.*, 1997, Yap *et al.*, 1999).

2.7.2 Humorale Abwehr gegen *T. gondii*

Die humorale Abwehr spielt vor allem in der akuten Phase der Infektion eine entscheidende Rolle. Hierbei wird zwischen der alternativen Aktivierung des Komplementsystems, das aus den Faktoren C1-C9 besteht, als unspezifischem Teil der humoralen Abwehr und der Stimulation von B-Lymphozyten, welche daraufhin spezifische Antikörper in Form von Immunglobulinen bilden, als spezifischem Teil der humoralen Abwehr unterschieden. Die Antikörper-Produktion führt, mit dem Ziel der Elimination extrazellulärer Toxoplasmen, zur Auslösung des klassischen Weges der Komplementaktivierung (Giese, 2004). Außerdem binden die von den B-Zellen produzierten Antikörper die Toxoplasmen-Antigene und markieren sie für eine

anschließende Vernichtung durch Immunzellen und Komplementfaktoren (Kirchner *et al.*, 1993).

Bezüglich der unspezifischen humoralen Antwort konnten Fuhrmann und Joiner 1989 zeigen, daß der alternative Weg der Aktivierung des Komplementsystems nach Bindung der C3-Komponente an die Toxoplasmenmembran ohne Ausbildung eines lytischen Komplexes abbricht. Hierbei wird das C3-Fragment aufgrund der Beschaffenheit der Membran von *T. gondii* in ein inaktives iC3-Fragment gespalten.

Die TH2-Subpopulation der CD4-positiven T-Helferzellen löst die spezifische humorale Immunantwort aus (Nischik *et al.*, 2003). Hierfür sezernieren die TH2-Zellen vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, wodurch sie zelluläre Immunreaktionen regulieren und B-Lymphozyten stimulieren, welche schließlich die Antikörper-Produktion übernehmen. Während einer Infektion mit *T. gondii* werden so verschiedene spezifische Antikörper gebildet, die eine Infektion von Wirtszellen durch *T. gondii* verhindern (Sayles *et al.*, 2000). Die Adhäsion der spezifischen Antikörper an der Parasitenoberfläche erschwert die Invasion von *T. gondii* in die Wirtszelle (Nischik *et al.*, 2003).

2.8 Struktur der Tachyzoiten und Bradyzoiten

Lichtmikroskopisch lassen sich Tachyzoiten und Bradyzoiten kaum unterscheiden. Beide Formen weisen eine durchschnittliche Länge von 5 µm und eine Breite von ca. 2 µm auf (Weiss und Kim, 2000) und liegen in der für *T. gondii* typischen, gebogenen Form vor. Im Aufbau weist *Toxoplasma gondii* die klassischen Organellen einer eukaryontischen Zelle, wie beispielsweise einen Zellkern, ein Endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien und einen Golgi-Apparat auf. Elektronenmikroskopisch lassen sich Tachyzoiten und Bradyzoiten durch für sie typischen Organellen differenzieren. Der Zellkern der Tachyzoiten liegt beispielsweise im Zentrum der Zelle, bei den Bradyzoiten befindet sich der Zellkern am posterioren Pol. Auffällig für die Bradyzoiten ist eine Anhäufung von Amylopektin-haltigen Granula, die vermutlich der Energieversorgung der Ruhestadien dienen (Weiss *et al.*, 2000), welche kaum bei den Tachyzoiten beobachtet werden können (Dubey *et al.*, 1998; Guérardel *et al.*, 2005).

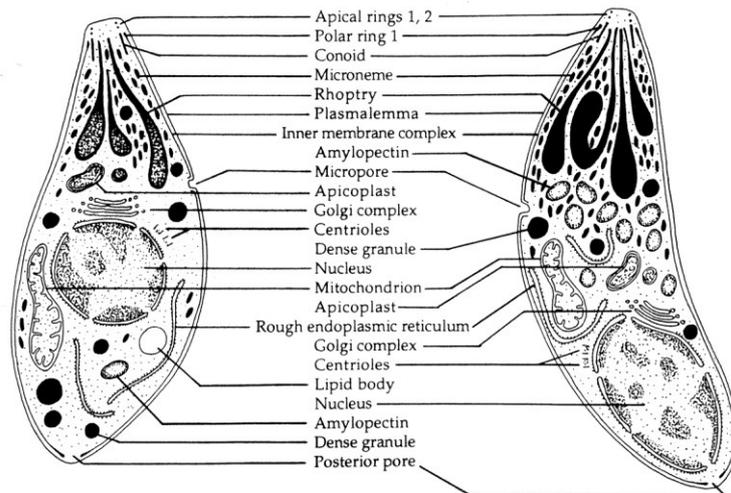


Abbildung 2:

Schematische Darstellung eines Tachyzoiten (links) und eines Bradyzoiten (rechts) von *T. gondii* (Quelle: Dubey et al., 1998)

Desweiteren zeichnen sich Bradyzoiten dadurch aus, dass der Zitratzyklus inaktiviert ist und eine funktionelle Atmungskette fehlt (Denton *et al.*, 1996).

T. gondii ist von einer Pellicula, welche ihrerseits aus drei Membranen besteht, umgeben, nämlich der Plasmamembran und zwei inneren Membranen IMC1 und IMC2, die den inneren Membrankomplex bilden. Die Pellicula erstreckt sich von den präkonoidalen Ringen am apikalen Pol bis zum posterioren Ende der Zelle (Dubremetz und Torpier, 1978). Am apikalen Pol des Parasiten liegt der für die Gattung der Apicomplexa typische Apikalkomplex, der aus dem Conoid, dem Polringkomplex, subpellikulären Mikrotubuli sowie zwei sekretorischen Organellen, den Rhoptrien und den Mikronemen, besteht (Carruthers 2002; Dubey *et al.*, 1998). Die Rhoptrien sehen in Tachyzoiten keulenförmig, in Bradyzoiten schleifenförmig aus. Eine dritte Klasse von sekretorischen Organellen, die Dichten-Granula auch als „dense granules“ bezeichnet, sind im gesamten Zytoplasma der Tachyzoiten als auch der Bradyzoiten vorhanden (Carruthers, 1999). Der Apikalkomplex dient als Penetrationsapparat, mit dem der Parasit in seine Wirtszelle eindringen kann (Morrissette *et al.*, 2002). Tachyzoiten sind in der Lage die Conoidstruktur auszufahren und durch rotierende Bewegungen die Penetration der Wirtszelle zu vollziehen (Hu *et al.*, 2002).

Charakteristisch für die langsam wachsenden Bradyzoiten ist eine Säure- und Peptidaseresistenz, wodurch sie die Magenpassage unbeschadet überstehen (Jacobs *et al.*, 1960), während die Tachyzoiten unter diesen Bedingungen ihre Infektiösität in kürzester Zeit verlieren. Eine ca. 60 µm große Gewebszyste kann hierbei 500 bis 2000 Bradyzoiten enthalten und ist von einer elastischen Zystenwand aus Lektinen und Chinin aufgebaut. Nach oraler Aufnahme einer solchen Zyste wird die Zystenwand im

Gastrointestinaltrakt durch Pepsin und Trypsin verdaut und die Peptidase-resistenten Bradyzoiten werden freigesetzt (Weiss und Kim, 2000). Die freigewordenen Bradyzoiten können Zellen direkt infizieren, ohne sich vorher in Tachyzoiten umwandeln zu müssen. Ein weiteres Unterscheidungskriterium zwischen Tachyzoiten und Bradyzoiten sind die verschiedenen Antigene (Kasper, 1989), die jedes Stadium aufweist. So konnten durch den Einsatz von Antikörpern als auch in T-Zell-Versuchen spezifische Oberflächenantigene von Tachyzoiten, die sog. „surface antigene“ SAG1 und SAG2, identifiziert werden (Mineo *et al.*, 1993). Neben SAG1 und SAG2 konnte das Rhoptrien-Protein ROP9 exklusiv nur in Tachyzoiten als sekretiertes Protein nachgewiesen werden (Reichmann *et al.*, 2002). Bei der Umwandlung vom Tachyzoiten zum Bradyzoiten im Rahmen einer Stressreaktion wie beispielsweise einer pH-Wert-Erhöhung findet eine Veränderung der Tachyzoitenoberfläche statt. So werden beispielsweise die Oberflächenantigene SAG1 und SAG2 durch SAG4 und BSR4 ersetzt (Bohne *et al.*, 1999; Lekutis *et al.*, 2000). Weitere Bradyzoiten-spezifische Antigene konnten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. So konnte das „Bradyzoiten-Antigen“ BAG1, welches im Zytoplasma der Ruhestadien lokalisiert ist, als auch das Protein p34, welches auf der Oberfläche der Bradyzoiten exprimiert wird, als Bradyzoiten-spezifisch identifiziert werden (Bohne *et al.*, 1995; Sibley *et al.*, 1995). Generell wandeln sich Tachyzoiten bei einer Temperaturerhöhung als auch einer pH-Werterhöhung oder –erniedrigung zu Bradyzoiten um (Weiss und Kim, 2000). In der Maus kann die Stadienkonversion vom Tachyzoiten zum Bradyzoiten durch steigenden Immundruck und Aktivierung muriner Makrophagen initiiert werden. Durch die Sekretion von INF- γ wird die Expression Bradyzoiten-spezifischer Proteine ausgelöst (Bohne *et al.*, 1993). Werden die Stress-auslösenden Faktoren verringert, kann es auch wieder zu einer Umwandlung von Bradyzoiten zu Tachyzoiten kommen, was auch im Rahmen einer Reaktivierung einer chronischen Toxoplasmose erfolgt (Gross *et al.*, 1996).

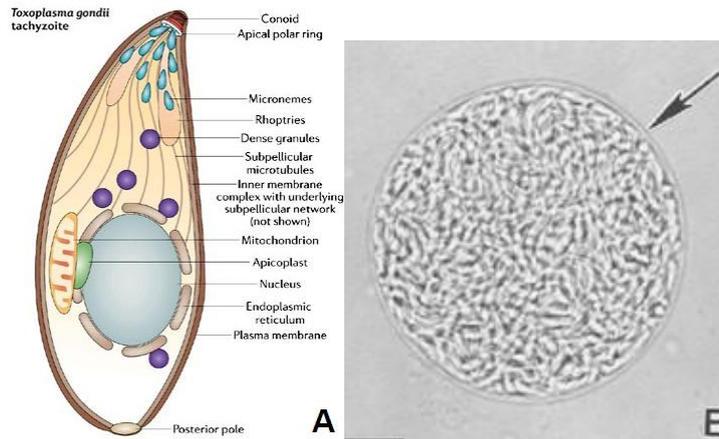


Abbildung 3: *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten und Bradyzoiten

(A) Schematischer Aufbau eines *T. gondii*-Tachyzoiten. Der Apikalkomplex besteht aus dem Conoid, den subpellikulären Mikrotubuli sowie den sekretorischen Organellen Rhoptrien und Mikronemen. Er dient als Penetrationsapparat zum Eindringen in die Wirtszelle. Alle Apikalkomplexe besitzen die Dichten Granula, eine dritte Art sekretorischer Organellen, und einen Apikoplasten. (Quelle: (Baum *et al.*, 2006), modifiziert). (B) Gewebezyste aus dem Gehirn einer Maus. Der Pfeil deutet auf die Zystenmembran (Quelle: (Hill *et al.*, 2005)).

2.9 Invasion von *T. gondii* in die Wirtszelle

Die Penetration der Wirtszelle durch *T. gondii* ist ein aktiver Prozess, der durch Aktin-/Myosinfilamente (Dobrowolski *et al.*, 1997; Opitz *et al.*, 2002) des Parasiten innerhalb von Sekunden vollzogen wird (Carruthers *et al.*, 2007). Um eindringen zu können, nimmt *T. gondii* über verschiedene Rezeptoren Kontakt zur Wirtszelle auf. So bindet der Tachyzoit u.a. über das Oberflächenprotein SAG1 an Proteine auf der Wirtszelloberfläche (Ortega-Barria und Boothroyd, 1999). Unter dem Einfluss der Sekretion von Mikronemenproteinen (MIC-Proteine) lagert sich *T. gondii* mit seinem apikalen Pol an die Wirtszelle an und es kommt zu einer Umorganisation des Parasiten. Ein Proteinkomplex aus dem Transmembran-Adhäsin MIC2 und seinem Co-Protein M2AP wird für die enge Anlagerung des Parasiten an die Wirtszelle verantwortlich gemacht (Huynh *et al.*, 2006). Nach der Anlagerung wird eine feste Verbindung zwischen dem Parasit und der Wirtszelle, eine sog. „tight junction“, ausgebildet. Der Parasit beginnt seine Conoidstruktur auszufahren. Die Sekretion der Rhoptrienproteine (ROP-Proteine) führt anschließend zum aktiven Eindringen von *T. gondii* in die Wirtszelle, wobei sich der Parasit hierbei von der „tight junction“ ausgehend in die Wirtszelle einstülpt und hierbei eine Art „moving junction“ verwendet. Nach Abschluss der Invasion liegt *T. gondii* in einer „parasitophoren Vakuole“ (PV) umschlossen von der ursprünglichen Membran des Wirtes, der PVM (parasitophoren Vakuolen Membran). Die Wirtsmembran wurde jedoch während des Invasionsprozess weitgehend von Wirtszellproteinen befreit (Mordue *et al.*, 1999), welche durch ROP-Proteine ersetzt wurden. Die überwiegende Veränderung der PVM durch Parasiten-

spezifische Proteine verhindert eine Endozytose und schützt die PV vor lysosomaler Zersetzung (Hakansson *et al.*, 2001). *T. gondii* kann die PVM während seiner intrazellulären Entwicklung als sichere Barriere zum Wirtszell-Zytosol nutzen und durch integrierte Poren den Nährstoff- und Metabolitenaustausch vornehmen. Hierbei nutzt der Parasit ein tubulovesikuläres Netzwerk, das ihn ausgehend von seinem posterioren Pol mit der PVM verbindet und die Parasitophore Vakuole darüber hinaus stabilisiert (Spekker 2008).

2.10 Die sekretorischen Organellen von *T. gondii*

Rhoptrien, Mikronemen und die Dichten Granula stellen die charakteristischen, sekretorischen Organellen der Apikomplexa dar (Mercier & Cesbron-Delauw 2015). Untersuchungen zeigten, dass sie sowohl an der intrazellulären Vermehrung des Parasiten (Mercier *et al.*, 2002) als auch der Invasion in die Wirtszelle (Lovett & Sibley, 2002) essentiell beteiligt sind. Die drei Organellen lassen sich aufgrund ihrer Morphologie, ihrer Lokalisation innerhalb des Parasiten, als auch der Zusammensetzung ihrer Proteine voneinander unterscheiden.

2.10.1 Die Mikronemen

Die Mikronemen von *T. gondii* sind als zigarrenförmige Strukturen am vorderen (apikalen) Pol des Parasiten lokalisiert und initiieren durch Sekretion ihrer Proteine die gezielte Adhäsion des Parasiten an die Wirtszelle. Die Ausschüttung der Mikronemen-Proteine (MIC-Proteine) erfolgt direkt nach Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle (Wan *et al.*, 1997). Über eine Erhöhung des zytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels des Parasiten kommt es zur Sekretion der MIC-Proteine (Carruthers, 1999). Nach Kontaktaufnahmen bildet sich eine sogenannte „tight junction“ zwischen dem Parasit und der Wirtszelle aus (Lovett *et al.*, 2002). Die „tight junction“ stellt eine feste Kontaktstelle dar, an der die Strukturen des Zytoskeletts von Wirt und Parasit in engem Kontakt stehen und die Wirtszellmembran für die bevorstehende Invasion unterbrochen vorliegt (Charron & Sibley 2004). Bisher konnten zwölf MIC-Proteine, die die Anlagerung und die feste Bindung an die Wirtszelle regulieren, identifiziert werden. Die Funktion der integralen Membranproteine MIC2, MIC6 und MIC8 besteht wahrscheinlich in einer Verbindung von Wirtszellrezeptoren mit dem Bewegungsapparat des Parasiten (Brydges *et al.*, 2008). An der Invasion sind neben MIC2 (Harper *et al.*, 2006) auch die Proteine MIC1, MIC3 und MIC4 als Adhäsine beteiligt. Die MIC-Proteine ermöglichen *T. gondii* darüber hinaus ein Substrat-abhängiges Gleiten und unterstützen dadurch die Fortbewegung des Parasiten über Oberflächen

(Carruthers & Sibley 1999). *T. gondii* weist im Gegensatz zu anderen Apicomplexa-Stämmen eine geringe Anzahl an Mikronemen auf, was dadurch begründet ist, dass die Tachyzoiten nur kurze Distanzen überwinden müssen, um benachbarte Zellen zu infizieren. Das Protein MIC5, welches Gegenstand dieser Arbeit ist, wird als Präprotein exprimiert und proteolytisch in ein 22 kDA reifes Protein umgewandelt. MIC5 zeigt keine Transmembrandomäne und scheint an der Außenseite mit der Membran verbunden zu sein (Brydges *et al.*, 2006). Es befindet sich überwiegend an der Zelloberfläche des Parasiten und kennzeichnet die Region der „moving junction“ während der Invasion des Parasiten in die Wirtszelle. Eine ausbleibende MIC5-Expression kann die komplette ESA („excreted secreted antigens“)-Sekretion indirekt verändern, da MIC5 häufig eine koregulatorische Funktion auf die Sekretion anderer von *T. gondii* sezernierter Antigene aufweist (Brydges *et al.*, 2006). Desweiteren spielt MIC5 eine wichtige Rolle für die Interaktion der MIC-Proteine untereinander. In DNA-Sequenzanalysen von TgMIC5 konnte gezeigt werden, dass MIC5 wahrscheinlich die Faltung weiterer MIC-Proteine unterstützt und somit deren Funktion bei der Invasion von *T. gondii* in die Wirtszelle (Brydges *et al.*, 2000).

2.10.2 Die Rhoptrien

Rhoptrien sind lang gestreckte, kegelförmige Organellen und befinden sich am vorderen Pol von *T. gondii*. Während der Invasion in die Wirtszelle wird der Inhalt der Rhoptrien, die Rhoptrienproteine (ROP-Proteine), über einen dünnen Kanal, mit dem diese Organellen am apikalen Pol befestigt sind, in die Parasitophore Vakuole (PV) ausgeschüttet. Die ROP-Proteine spielen nach derzeitigem Wissen eine Rolle beim Aufbau der Parasitophoren Vakuole. Außerdem wird die „moving junction“ aus einem Komplex von „rhoptry neck proteins“ (RON2/4/5/8), die von den Rhoptrien sezerniert werden, und der TgAMA1 („Toxoplasma gondii apical membrane antigen 1“), einem Mikronemenprotein gebildet. Hierbei weisen TgAMA1 sowie RON2 Transmembrandomänen auf, die an die Wirtszelle binden und somit die Invasion ermöglichen (Lamarque *et al.*, 2011). Darüber hinaus findet ein aktiver Austausch der Transmembran- und Membran-assoziierten Proteine durch ROP-Proteine, wie ROP1 und ROP2 während des Einstülpens der Wirtszellmembran statt (Joiner *et al.*, 2002). Darüber hinaus verbleiben einige ROP-Proteine im Wirts-Zytosol oder gelangen in den Wirts-Nukleus und bewirken die Umprogrammierung der Genexpression des Wirtes mit (Boothroyd & Dubremetz 2008). Bislang wurden etwa 40 verschiedene ROP-Proteine in *T. gondii* identifiziert. Hierbei reguliert beispielsweise die Proteinkinase ROP18 das intrazelluläre Wachstum von *T. gondii* (El Hajj *et al.*, 2007). ROP18 ist eine Kinase, die immunologisch wichtige GTPasen

des Wirtes phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung wird die INF- γ -gesteuerte Makrophagenaktivierung gehemmt und *T. gondii* gewinnt an Virulenz (Fentress *et al.*, 2010).

Die Funktion des ROP2 besteht beispielsweise darin eine Anlagerung der Wirtszell-eigenen Mitochondrien sowie des Endoplasmatischen Retikulums an die Außenseite der Parasitophoren Vakuole zu organisieren (Sinai und Joiner, 2001). Durch Interaktion mit den wirtseigenen Mitochondrien sowie dem Endoplasmatischen Retikulum wird ein Lipidtransport in die Parasitophore Vakuole ermöglicht, da der Parasit zur de novo Fettsäuresynthese selbstständig nicht in der Lage ist (Sinai *et al.*, 1997). Die Sekretion der ROP-Proteine stellt einen Ca^{2+} -unabhängigen Prozess dar und schließt sich unmittelbar der Ca^{2+} -abhängigen MIC-Protein-Ausschüttung an (Carruthers und Sibley, 1997).

2.10.3 Die Dichten-Granula

Die Dichten-Granula, auch als „dense granules“ in der Literatur bezeichnet, sind elektronendichte, runde Organellen, die anders als die Rhoptrien und Mikronemen im kompletten Zytoplasma von *T. gondii* verteilt vorkommen. In den Dichten-Granula sind die GRA-Proteine angereichert, die den Hauptanteil der sogenannten „excreted-secreted antigens“ (ESA's) von *Toxoplasma gondii* bilden. Nach der Invasion des Parasiten werden die GRA-Proteine vom apikalen Pol in die Parasitophore Vakuole sezerniert (Michelin *et al.*, 2009). Im Gegensatz zur zeitlich begrenzten Sekretion der MIC- und ROP-Proteine vor und während der Invasion in die Wirtszelle geschieht die Sekretion der GRA-Proteine kontinuierlich während des vollständigen Entwicklungszeitraums des Parasiten in der PV (Carruthers und Sibley, 1999) und stellt einen Ca^{2+} -unabhängigen Prozess dar (Karsten *et al.*, 1998; Chaturvedi *et al.*, 1998). Die Funktion der GRA-Proteine liegt darin einen Nährstofftransport von der Wirtszelle weg und einen Abtransport von Stoffwechselprodukten zur Wirtszelle hin zu unterstützen. Auf diese Weise wird das intrazelluläre Überleben des Parasiten gesichert. Hierbei wird durch Assoziation der Parasitophoren Vakuolen Membran (PVM) zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) als auch zu den Mitochondrien des Wirtes der Stoffaustausch zwischen Parasit und Wirt ermöglicht (Sinai *et al.*, 1997). Einige GRA-Proteine wie beispielsweise GRA2, GRA4 und GRA6 initiieren die Ausbildung eines intravakuolären Netzwerks, das die Parasitophore Vakuole durchzieht und einen Umbau der Vakuolenmembran verursacht (Mercier *et al.*, 2002). PVM-interagierende GRA-Proteine scheinen ebenfalls für die Ausbildung von Poren in der Membran der PV verantwortlich zu sein, welche die Diffusion niedermolekularer Stoffe, wie Aminosäuren, ATP und Zucker ermöglicht (Schwab *et al.*,

1994). Bislang sind 23 GRA-Proteine beschrieben (Rommereim *et al.*, 2016). Zu den 23 aus den Dichten- Granula sezernierten Proteine gehören auch beispielsweise zwei Isoformen einer Nukleotid-Triphosphat-Hydrolase (NTPase I und II) (Bermudes *et al.*, 1994; Asai *et al.*, 1995) als auch zwei Proteaseinhibitoren (TgPI 1 und 2) (Morris *et al.*, 2002; Pszenny *et al.*, 2016). Die NTPase I und II unterstützt essentiell die Versorgung des Parasiten mit Purinen aus der Wirtszelle. *T. gondii* ist seinerseits nur zur *de novo*-Synthese von Pyrimidinen in der Lage und somit auf Purine aus der Wirtszelle angewiesen (Bermudes *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur NTPase konnte den meisten GRA-Proteinen bis zum heutigen Zeitpunkt keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Untersuchungen zeigten, dass sie den Stoffaustausch zwischen Wirt und Parasit unterstützend beeinflussen. So wird GRA2 beispielsweise nach der Wirtszellinvasion in die Parasitophore Vakuole sezerniert und scheint aufgrund seiner molekularen Helix-artigen Struktur, die durch zwei amphipathische α - Helices ausgebildet wird, mit dem tubulovesikulären Netzwerk verbunden. GRA4 und GRA6 interagieren mit GRA2 über hydrophobe und Protein-Wechselwirkungen und bilden einen speziellen multimerischen Komplex aus. Dieser Komplex ist stabil mit dem tubulovesikulären Netzwerk assoziiert ist und scheint am Nährstoff- und Proteintransport beteiligt zu sein (Nam, 2009). Darüber hinaus wird den GRA-Proteinen eine Rolle als stark immunogen wirkende Antigene zugeschrieben. So konnten Mäuse eine üblicherweise letale Infektion mit Bradyzoiten nach einer Immunisierung mit einer „excreted-secreted-antigen“(ESA)-Präparation, die überwiegend GRA-Proteine enthielt, überleben (Darcy *et al.*, 1992). In Knock-Out-Versuchen mit Mutanten für die Proteine GRA 1-10, konnte gezeigt werden, dass die Proteine GRA1 und GRA10 vermutlich eine essentielle Funktion für das Wachstum des Parasiten haben. Die GRA-Proteine 2-9 scheinen keine wesentliche Funktion im Rahmen der Virulenz zu spielen, zeigen allerdings eine wichtige Funktion im Aufbau des intravakuolären Netzwerks. So waren Δ GRA2- und Δ GRA6-Mutanten nicht in der Lage ein intravakuoläres Netzwerk aufzubauen. Δ GRA7- Mutanten wiesen eine überschießende Ausbildung des intravakuolären Netzwerks auf (Rommereim *et al.*, 2016).

2.10.3.1 Charakterisierung und Lokalisation der GRA-Proteine

GRA-Proteine werden in löslicher Form in die Parasitophore Vakuole (PV) sezerniert (Lecordier *et al.*, 1999) und anschließend zu typischen Zielstrukturen transportiert. So

lässt sich zwischen frei in der PV vorliegenden GRA-Proteinen und solchen, die an der Membran der Parasitophoren Vakuole (PVM) oder aber am tubulovesikulären Netzwerk assoziiert vorkommen, unterscheiden (Mercier *et al.*, 2002).

GRA1 (24 kDa) ist in den Dichten Granula von Tachyzoiten als auch Bradyzoiten zu finden. Es weist mehrere Ca^{2+} -bindende Domänen auf, die einen physiologischen Stellenwert in der Wirtszell-Invasion spielen könnten. Nach der Invasion wird GRA1 als lösliches Protein in das Lumen der PV sezerniert und tritt anschließend in Assoziation mit dem tubulovesikulären Netzwerk (Sibley *et al.*, 1995; Nam HW., 2009).

GRA2 (28 kDa) kommt sowohl als Membran-gebundene als auch lösliche Form in der PV und den Dichten Granula vor. Die Aminosäuresequenz von GRA2 weist drei amphipatische Alpha-Helix Domänen auf über die GRA2 mit der membranösen Netzwerkstruktur verbunden ist (Cesbron-Delauw 1994; Sibley *et al.*, 1995). Außerdem konnte gezeigt werden, dass GRA2 für die Ausbildung des intravakuolären Netzwerks essentiell ist (Mercier *et al.*, 1998).

GRA3 (30 kDa) wird als lösliches Protein sezerniert und zeigt über eine kurze hydrophobe Region (Ossorio *et al.*, 1994) vor allem Interaktionen mit der PVM als auch weniger häufig mit dem tubulovesikulären Netzwerk innerhalb der PV (Dubremetz *et al.*, 1993).

GRA4 (40 kDa) liegt vorwiegend als lösliches Protein in den „dense granules“ vor und wird vom apikalen Pol in das Lumen der PV sezerniert (Labruyère *et al.*, 1999). Es interagiert über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit GRA2 und GRA6 in einem Komplex zur Ausbildung des tubulovesikulären Netzwerks (Mercier *et al.*, 2002; Nam HW., 2009).

GRA5 (21 kDa) wird als lösliches Protein in die PV entlassen, lagert sich an die PVM an und durchspannt aufgrund einer für das Protein spezifischen Transmembrandomäne die Membran der Parasitophoren Vakuole (Lecordier *et al.*, 1999; Nam HW., 2009).

GRA6 (32 kDa) liegt ebenfalls als lösliches Protein in den Dichten Granula vor und wird nach Sekretion vom apikalen zum posterioren Pol transportiert. GRA6 als auch GRA2 sind durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Etablierung und Stabilisierung der tubulovesikulären Netzwerkstruktur beteiligt mit welcher GRA6 interagiert (Mercier *et al.*, 2002). Durch die Interaktion von GRA6 mit GRA2 und GRA4 über hydrophobe und Protein-Protein-Wechselwirkungen bildet sich ein multimerer Proteinkomplex aus (Labruyère *et al.*, 1999).

GRA7 (30 kDa) ist wie GRA3 und GRA5 mit der Membran der Parasitophoren Vakuole (PVM) assoziiert. Das Protein GRA7 weist wie GRA4, GRA5, GRA6 (Jacobs *et al.*, 1998) eine Transmembrandomäne auf, die die Insertion in der PVM als integrales Membranprotein ermöglicht.

GRA8 (40 kDa) lagert sich an die Membran der PV an und wird während oder kurz nach der Invasion des Parasiten in die PV sezerniert. Durch Aminosäuresequenzanalysen konnte eine zentrale Prolin-reiche Region identifiziert werden, die eine entscheidende Rolle bei Membraninteraktionen spielen könnte (Carey *et al.*, 2000).

GRA9 (41 kDa) wird vom apikalen Pol des Parasiten in die PV entlassen und interagiert mit den Membranen der PV (Adjogble *et al.*, 2004). Wie alle anderen GRA-Proteine besitzt die Aminosäuresequenz von GRA9 eine hydrophobe Region, die als Signalpeptid für die Sekretion des Proteins dient.

GRA10 (36 kDa) wird zu den Hauptvertretern der „excreted-secreted antigens“ (ESA) gezählt und ist bereits vor Invasion in die Wirtszelle nachweisbar. GRA10 wird jedoch hauptsächlich während bzw. kurz nach der Invasion in die Parasitophore Vakuole entlassen und ist eng mit der PVM assoziiert (Ahn *et al.*, 2006).

GRA12 wird ähnlich GRA2 und GRA6 zu Beginn der Invasion am apikalen Pol des Parasiten in die PV sezerniert und zum posterioren Pol transportiert. Hier verbleibt es eng assoziiert mit dem tubulovesikulären Netzwerk. Der Transport von GRA12 zum posterioren Pol ist von GRA2 abhängig. GRA12 wurde als lösliches als auch Membran-gebundenes Antigen beschrieben (Michelin *et al.*, 2009).

GRA14 ist mit dem tubulovesikulären Netzwerk als auch der den Parasiten umgebenden PVM assoziiert. Seine Struktur zeigt die Besonderheit, dass das Protein mit seinem C-terminalen Ende in das Wirtszelle-Zytoplasma ragt, während das N-terminale Ende in das Lumen der PV reicht (Rome *et al.*, 2008).

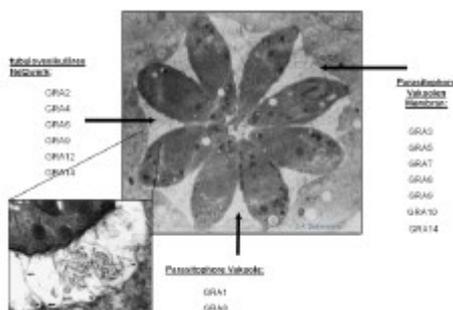


Abbildung 4:
Lokalisation der GRA-Proteine in der Parasitophoren Vakuole
(Quelle: Sibley *et al.*, 1995, Dubremetz)

2.11 Zielsetzung der Arbeit

Eine Infektion mit *T. gondii* stellt im klinischen Alltag gerade für Schwangere und ihre ungeborenen Kinder als auch für immunsupprimierte Patienten, hier vorwiegend im Sinne einer reaktivierten Toxoplasmose, eine ernst zu nehmende Diagnose dar. Die derzeitige Therapie einer bestehenden Infektion greift ungerichtet in die Proteinbiosynthese oder

aber den Folsäurestoffwechsel des Parasiten ein. Im Verlauf einer Infektion mit *T. gondii* werden während des kompletten Entwicklungszyklus des Parasiten GRA-Proteine sezerniert, die als „excreted-secreted antigens“ eine immundominante Rolle einnehmen.

Hier setzt die vorliegende Arbeit ein, deren Zielsetzung es ist, die Eignung spezifischer GRA-Proteine als Marker einer akuten oder chronischen *T. gondii*- Infektion zu identifizieren. Zum Einsatz der spezifischen Proteine als Antigene in serologischen Analysen wurde rekombinantes GRA1(rGRA1), rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 durch Insertion des jeweiligen c-DNA-Konstrukts in einen Expressionsvektor hergestellt. Die Proteine wurden denaturierend mittels SDS-page aufgereinigt und die *T. gondii*-spezifischen Antigene wurden in semiquantitativen Tests eingesetzt. Um eine mögliche Rolle dieser immunogen wirkenden Proteine beispielsweise als potentielle Antigene zum Nachweis einer Infektion mit *T. gondii* zu untersuchen, wurden unterschiedliche Seren von Patienten mit Toxoplasmose auf spezifische Antikörper gegen diese Parasiten-spezifischen Proteine analysiert.

So sollte im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit einer Detektion spezifischer humaner Immunglobuline der Klasse G gegen die einzelnen rekombinant hergestellten Proteine untersucht werden, um unter Umständen eine unterschiedliche Immunität der einzelnen GRA-Proteine im Verlauf einer Infektion zu zeigen und darüber hinaus Ihr Nutzen als diagnostisches Hilfsmittel zu evaluieren. Hierfür wurden nach Genehmigung durch das Ethikvotum Studiennummer 3174 insgesamt 48 Seren mit verschiedenen IFT-Titern analysiert.

Gerade im Rahmen der Toxoplasmose-Diagnostik bei Schwangeren ist besonderes Augenmerk auf die Detektion von spezifischen IgM- und IgA- Antikörpern als Zeichen einer akuten Infektion, die für das Ungeborene schwerwiegende Folgen nach sich ziehen kann, zu richten. Die humanen Immunglobuline IgM und IgA können zu Beginn einer Infektion im Serum der betroffenen Patienten ansteigen. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern der IgM- und IgA-Klasse im peripheren Blut gilt als Hinweis für eine konnatal erworbene Toxoplasmose. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob spezifische Immunglobuline der Klasse M und A gegen die rekombinanten GRA- Proteine und das rekombinante MIC5-Protein gerade in der frühen Phase der Infektion ein sinnvolles diagnostisches Werkzeug darstellen könnten. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit nach Genehmigung durch das Ethikvotum Studiennummer 3174 14 Seren von Patienten mit einer akuten *T. gondii*-Infektion mit einem ISAGA-Titer $\geq 1:6400$ untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad „pro analysis“. Zum Ansetzen von Medien und Lösungen wurde Reinstwasser verwendet (Hausanlage Millipore GmbH, Schwalbach).

3.1.1 Plasmide

3.1.1.1 Verwendete Plasmide

Plasmidbezeichnung	Bezugsquelle
pET32a(+)	Novagen (Darmstadt)
pET32a(+)-GRA1	in dieser Arbeit hergestellt
pET32a(+)-GRA2	in dieser Arbeit hergestellt
pET32a(+)-GRA6	in dieser Arbeit hergestellt
pET32a(+)-GRA7	in dieser Arbeit hergestellt
pET32a(+)-GRA9	in dieser Arbeit hergestellt
pET32a(+)-MIC5	in dieser Arbeit hergestellt

3.1.2 Desoxyoligonukleotide

Die aufgelisteten Desoxyoligonukleotide („Primer“) wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Lagerung der Primer erfolgte bei einer Temperatur von -20°C .

3.1.2.1 Primer zur Klonierung und Mutagenese

(Restriktionsschnittstellen unterstrichen)

Primerbezeichnung	Sequenz
GRA1 forward	5`- CGC <u>GAA TTC</u> GCT GCT GCA TCG GT-3`
GRA1 reverse	5`- CGC <u>AAG CTT</u> CTC TCT CTC TCT TGA TA -3`
GRA2 forward	5`- ATA ATA <u>GAA TTC</u> CTG GTT GTT GCC GTT-3`
GRA2 reverse	5`-CGC <u>AAG CTT</u> CTG CGA AAA GTC TGG GA-3`
GRA6 forward	5`-GCG <u>GAA TTC</u> AGG CAG AAG CGA AAC T-3`
GRA6 reverse	5`-CGC <u>AAG CTT</u> ATA ATC AAA CAC AT-3`
GRA7 forward	5`-CGC <u>GGA TCC</u> GCG CTT TGT GTT TTA-3`
GRA7 reverse	5`-CGC <u>GAG CTC</u> CTG GCG GGC ATC CT-3`
GRA9 forward	5`-CGC <u>GAA TTC</u> GTC GTG CCC CTC TC-3`
GRA9 reverse	5`-CGC <u>AAG CTT</u> GAG TCC TCG GTC TT-3`
MIC5 forward	5`-CGC <u>AAG CTT</u> TTA GCC TCG CAT TTA CGC-3`
MIC5 reverse	5`-CGC <u>CTC GAG</u> CC TCG GAG TCG AGC CCA-3`

3.1.3 Antikörper

3.1.3.1 Primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle	Einsatz im Western Blot
Humanseren aus Gründen des Datenschutzes im Folgenden fortlaufend nummeriert	Uniklinikum Düsseldorf (Serologie des Instituts für Med. Mikrobiologie und Krankenhaushygiene)	1:100
anti-Tg-GRA1:	M-F. Cesbron-Delauw (Grenoble, Frankreich)	1:1000
anti-Tg-GRA2:	M-F. Cesbron-Delauw (Grenoble, Frankreich)	1:1000
anti-Tg-GRA7:	M-F. Cesbron-Delauw (Grenoble, Frankreich)	1:1000
anti-Tg-GRA9:	Uniklinikum Düsseldorf Institut für Medizinische Mikrobiologie u. Krankenhaushygiene AG W. Däubener	1:1000

3.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Markierung/Spezies	Quelle/Einsatz
anti-Maus IgG/PO:	Monoklonal aus Ziege gg. Maus-IgG, Peroxidase- konjugiert	Jackson Immuno Research Dianova Hamburg 1:1000 im Western Blot
6-Histidin-Epitop-Tag IgG1-Ak/PO:	monoklonal aus Maus gg.His ₆ -Epitop-IgG Peroxidase- konjugiert	Jackson Immuno Research Dianova Hamburg 1:1000 im Western Blot
anti-Human IgG/AP:	monoklonal, aus Hase gg. humanes IgG, Alkalische Phosphatase (AP) -konjugiert	Jackson Immuno Research Dianova Hamburg 1:1000 im Western Blot
anti-Human IgM/AP:	monoklonal, aus Ziege gg. humanes IgM, AP-konjugiert	Jackson Immuno Research Dianova Hamburg 1:1000 im Western Blot
anti-Human IgA/AP:	monoklonal, aus Hase gg. humanes IgA, AP-konjugiert	Jackson Immuno Research Dianova Hamburg 1:1000 im Western Blot

3.1.4 Restriktionsenzyme für die Molekularbiologie

3.1.4.1 Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme	Bezugsquelle
BglI	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl
BamHI	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl
EcoRI "fast digest"	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl
HindIII "fast digest"	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl
PvuI "fast digest"	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl
PvuII "fast digest"	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl
SacI "fast digest"	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl
StyI "fast digest"	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl
XhoI "fast digest"	Fermentas (St. Leon-Roth) 10 U/μl

3.1.5 Sonstige Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
DNase I	Roche Diagnostics (Mannheim)
Expand-High-Fidelity-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteinase K	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase A	Roche Diagnostics (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Promega (Mannheim) 60 U/ μ l
Taq-Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim) 5 U/ μ l

3.1.6 Größenstandards

3.1.6.1 Größenstandards für Nukleinsäuren

Um die Größen getrennter DNA-Fragmente in Agarosegelen zu bestimmen wurde die „1-kb-DNA-Leiter“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) als Standard eingesetzt. Die Lagerung der „1-kb-DNA-Leiter“ erfolgte bei -20°C .

Fragmentgrößen der „1-kb-DNA-Leiter“ [bp]:

10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250

3.1.6.2 Größenstandards für Proteine

Zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteingrößenstandards der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. In der folgenden Tabelle sind die molekularen Massen der SeeBlue Plus2 Pre-stained Standardproteine aufgelistet.

Proteine des Größenstandards	Tris-Glycine [kDa]	NP MOPS [kDa]
Myosin	250	191
Phosphorylase	148	97
BSA	98	64
Glutamic Dehydrogenase	64	51
Alkohol Dehydrogenase	50	39
Carbonic Anhydrase	36	28
Myoglobin Red	22	19
Lysozyme	16	14
Aprotinin	6	n/a
Insulin, B Chain	4	n/a

Tabelle 1: Molekulargewichte der Proteingrößenstandards von SeeBlue Plus2

3.1.7 Medien und Puffer

Alle verwendeten Puffer und Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt. Puffer und Lösungen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten sowie für die Zellkultur wurden für 60 min bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert.

<u>Iscove's modified Dulbecco's medium:</u> (Lonza Walkersville, USA)	IMDM 25 mM HEPES + L-Glutamin
<u>Zellkultur-Medium:</u>	500 ml IMDM 10 % (v/v) Fötale Kälberserum 25 µg/ml Gentamycin
<u>TBE-Puffer:</u>	89 mM Tris-HCl 89 mM Borsäure 2,5 mM EDTA pH 7
<u>LB (Luria-Bertani)-Medium:</u>	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl ad 1000 ml mit H ₂ O pH 7 mit 5 N NaOH; autoklaviert
<u>LB-Platten:</u>	LB-Medium 1,2 % Bacto-Agar 100 µg/ml Ampicillin (nach Abkühlung)
<u>dNTP-Mix:</u> (Promega)	40 µM dATP 40 µM dCTP 40 µM dTTP 40 µM dGTP

<u>DPBS:</u> (Dulbecco's Phosphate-buffered saline)	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8
<u>AP-Puffer:</u>	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 100 mM MgCl ₂ pH: 9,5
<u>Coomassie-Blue-Färbelösung:</u>	0,5 g Coomassie Brilliant Blue R250 100 ml Eisessig 500 ml Ethanol (100%) 500 ml H ₂ O
<u>Coomassie-Entfärber:</u>	725,5 ml H ₂ O 74,5 ml Eisessig 200 Ethanol (100%)

3.1.8 Feinchemikalien

Acrylamid:	Serva (Heidelberg)
Agarose:	Biozym (Oldendorf)
Ammoniumperoxodisulfat (APS):	Sigma (Taufkirchen)
Ampicillin:	Boehringer (Mannheim)
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat):	Fermentas (St. Leon-Roth)
CaCl ₂ :	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue R250:	Serva (Heidelberg)
Desoxynukleotide (dNTPs):	Fermentas (St. Leon-Roth)

Dimethylformamid:	Merck (Darmstadt)
Eisessig:	Merck (Darmstadt)
Ethanol:	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid:	Merck (Darmstadt)
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA), cell culture tested:	Riedel-de Haen (Seelze)
Fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert:	PAN-Biotech (Aidenbach)
Glutamin (200 mM):	BioWhittaker (Belgien)
Glutathion:	Merck (Darmstadt)
Glycerin:	Merck (Darmstadt)
Glycin:	Merck (Darmstadt)
Guanidinhydrochlorid:	Merck (Darmstadt)
Harnstoff:	Merck (Darmstadt)
Imidazol:	Merck (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG):	Merck (Darmstadt)
LB-Agar:	Roth (Karlsruhe)
LB-Medium:	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid:	Merck (Darmstadt)
Milchpulver:	Sigma (Taufkirchen)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED):	Sigma (Taufkirchen)
NaOH:	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid:	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS):	Schuchart (Hohenbrunn)
n-Butanol:	Merck (Darmstadt)
NBT (nitro blue tetrazolium):	Fermentas(St.Leon- Roth)
Salzsäure:	Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure:	Merck (Darmstadt)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris):	Merck (Darmstadt)
Tween-20:	Merck (Darmstadt)

3.1.9 Sonstige Materialien und Geräte

Blottingkammer:	Semidry, Bio-Rad (München)
Brutschränke:	Heraeus (Hanau), B5060 EK/CO ₂
Cutter:	Daehle 565 (Rödental)
Drehrad:	Labinco BV (Breda, Niederlande)

Elektrophoresekammer:	Vertical Gel Electrophoresis System, Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg)
Entwicklerkassette:	BASF Cassette 2040, Fujifilm(Düsseldorf)
Fluoreszenzmikroskop:	Zeiss (Köln), Photomikroskop II
Gelkammer (WB):	XCell Sure Lock Mini-Cell, invitrogen (Darmstadt)
Geltrockner:	Amersham Biosciences (Freiburg)
Kippschüttler:	Polymax 1040, Heidolph (Nürnberg)
NuPage 10%Polyacrylamid-Gele:	invitrogen (Darmstadt)
pH-Meßgerät:	Mettler Toledo MP225 pH-Meter (Giessen)
Pipetboy:	IBS Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Pipetten:	Labsystems (München), Finnpipette
Quarzküvetten:	Hellma, 100 µl (Jena)
Röntgenfilmkammer:	REGO (Haan)
Filme Hyperfilm™-ECL:	GE Healthcare (München)
Spannungsgeber:	Electrophoresis Power Supply 500V/400mA, Gibco BRL Invitrogen (Darmstadt)
Spektralphotometer:	DU 640, Beckman-Coulter (München)
Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A):	Flow Laboratories (Meckenheim)
Thermocycler:	PTC 200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research (Waltham, USA)
Vortexer:	Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Wasserbad:	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen:	Beckman J2-21 mit JA14 und JA20 Rotoren (München), Heraeus Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor (Hanau), Ultrazentrifuge Beckman Optima L60 Rotor SW41Ti (München), Heraeus Biofuge fresco (Hanau)

3.1.10 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel

Deckgläschen, Glas, ø 13 mm:	Hecht-Assistent (Sondheim)
Einmalspitzen:	Polylab (Seoul, Korea)
Cryo-Tubes:	Nunc GmbH (Wiesbaden)
Reaktionsgefäße, 0.5-2,0 ml:	Eppendorff (Hamburg)
Einmalspritzen, 1 ml:	Braun (Melsungen)
Einmalspritzen, 5-20 ml:	Braun (Melsungen)
Einwegküvetten:	Sarstedt (Nümbrecht)
Filterpapier Whatman 3MM:	VWR (Darmstadt)
Kanülen; Microlance, verschiedene Größen:	BD Becton Dickinson (Heidelberg)
96-well Mikrotiterplatte:	Greiner (Frickenhausen)
Nitrozellulosemembran Whatman „Protran“:	VWR (Darmstadt)
Petrischalen:	Greiner (Frickenhausen)
Perfusorspritzen, 50ml:	Braun (Melsungen)
Zellkulturschalen:	BD Becton Dickinson (Heidelberg)
Säulen Polypropylen, 1 ml:	Qiagen (Hilden)
Sterilfilter:	Millipore (Eschborn), Sterivex
Venofix und Adapter:	Braun (Melsungen)
Zellkulturflaschen, 25-175 cm ² :	Costar (Bodenheim)
Zellschaber:	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml:	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen „Polyallomer“:	Beckmann(14×89 und 13×51) (Krefeld)

3.1.11 Molekularbiologische Kits

High Pure Plasmid Isolation Kit:	Roche (Mannheim)
Gel Extraktion Kit:	Qiagen (Hilden)
Plasmid Mini/Midi Kit:	Qiagen (Hilden)
Plasmid Maxi Kit:	Qiagen (Hilden)

3.1.12 Antibiotika

Plasmid-transformierte Bakterien wurden in Medien mit entsprechendem Antibiotikumzusatz angezogen. Die Antibiotika wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen.

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

3.1.13 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
HFF-Zellen	humane Vorhaut Fibroblasten	ATCC

3.1.14 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> JM109:	K-12 derivative, <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdr17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> (<i>lac-proAB</i>)
<i>E. coli</i> DH5α:	<i>F</i> ; <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>deoR</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>)
<i>E. coli</i> BL21:	<i>F-</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B-m_B-</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , mit <i>DE3</i> Prophagen, der das <i>T₇</i> RNA-Polymerasegen trägt

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

3.1.15 Toxoplasma gondii-Stämme

<i>T. gondii</i>-Stamm	Bezugsquelle
RH:	Sabin, 1941, ATCC (Manassas, USA)

Tabelle 3: Verwendete *Toxoplasma gondii*-Stämme

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme wurden aus Glycerinkulturen oder von Einzelkolonien einer Agarplatte in steriles LB-Medium überimpft und über Nacht (ü. N.) bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Das LB-Medium wurde zusätzlich mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt. Am Folgetag erfolgte eine Subkultivierung von 200 ml LB-Flüssigmedium unter Zugabe von 5 ml Bakterien-Vorkultur und anschließender Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler. Für eine kurzfristige Lagerung wurden die Bakterienstämme auf LB-Agarplatten (Ampicillin-haltig) ausgestrichen. Eine Inkubation der Agarplatten erfolgte bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C. Auf Agarplatten ausgestrichen wurden die Bakterienstämme für 4-6 Wochen bei 4°C gelagert.

3.2.2 Stammkulturen

Eine längerfristige Lagerung von Bakterienkulturen erfolgte in Glycerinkulturen. Dazu wurde 1 ml einer Über-Nacht-Kultur (LB-Medium) mit 200 µl sterilem 87 %-igem (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der Optischen Dichte

Das Wachstum einer Bakterienkultur im Zeitverlauf konnte durch Messung der Optischen Dichte verfolgt werden. Die Messung wurde mit Einmal-Halbküvetten (Schichtdicke 1 cm) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) im Spektralphotometer vorgenommen. Der Nullabgleich erfolgte hierbei gegen unbeimpftes Medium.

3.2.4 Präparation von *Toxoplasma gondii*-Lysat

Zur Präparation von *T. gondii*-Lysat werden Zellen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen mechanisch aufgebrochen („Freeze and Thaw“). Hierfür wurden auf HFF-Zellen angezogene Toxoplasmen geerntet, zweimal in PBS gewaschen und für 10 min bei 672 g und 4°C abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in Proteaseinhibitor-haltigem PBS aufgenommen und auf eine Anzahl von 10⁹ Toxoplasmen/ml eingestellt. Anschließend wurde die Suspension dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Zur Separation unerwünschter, großer Membrantrümmer oder nicht aufgeschlossener Toxoplasmen wurde das Lysat erneut für 10 min bei 984 g und 4°C zentrifugiert und der erhaltene Überstand für weitere 10 min bei 14.196 g und 4°C zentrifugiert. Der resultierende Überstand setzt sich primär aus den löslichen Proteinen von *T. gondii*-Tachyzoiten zusammen und wird als *T. gondii*-Lysat (TLA) bezeichnet. Es erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung und eine anschließende Konservierung bei -70°C.

3.2.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur (ü. N-Kultur) des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei einer Temperatur von 37°C bis zu einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5-0,6 angezogen. Die *E. coli*-Kultur wurde in sterilen 50 ml-Röhrchen für 20 min. auf Eis gelagert und anschließend für 5 min bei 1344 g (bei 4000rpm) bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml RF1-Lösung aufgenommen und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Nach Resuspension wurden die Zellen erneut für 5 min abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 4 ml RF2-Lösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden 15 min auf Eis gelagert und als 200 µl Aliquots in sterile Cryo-Tubes überführt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

RF1-Lösung

RbCl	0,1 M
MnCl ₂	0,05 M
Kaliumacetat	0,03 M
CaCl ₂	0,01 M
Glycerin	15 % (v/v)

pH 5,8

RF2-Lösung

MOPS	0,01M
RbCl	0,01 M
CaCl ₂	0,075 mM
Glycerin	15 % (v/v)
	pH 6,8

3.2.6 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Hitzeschockmethode angewandt, deren Prinzip darin liegt, die Zellmembranen der Empfängerzellen durch Hitzeeinwirkung kurzzeitig für Moleküle wie Plasmid-DNA permeabel zu machen. Für die Transformation wurden 200 µl transformations-kompetente *E. coli*- Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 15 µl Ligationsansatz versetzt. Der Transformationsansatz wurde für 20 min auf Eis gelagert und anschließend für 90 sec bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Die transformierten *E. coli*- Zellen wurden anschließend erneut für 5 min auf Eis gekühlt, mit 800 µl LB-Medium versetzt und für 2 h unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Jeweils 50 µl und 100 µl der Suspension, sowie 50 µl konzentrierte Suspension (der Ansatz wurde für 30 sec bei 14196 g (bei 13.000 rpm) zentrifugiert und das Pellet in 300 µl LB-Medium aufgenommen) wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3 Serologische Analysen

Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Seren wurden in der serologischen Abteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf mittels verschiedener Tests voruntersucht.

3.3.1 Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IFT)

Wir verwendeten den „Toxo-Spot IF“ (REF 75 471) zum Nachweis spezifischer Immunglobuline der Klasse G. Auf „Toxo-Spot IF“-Objektträgern befinden sich mit Formalin behandelte Toxoplasmen des Stammes „RH Sabin“, die durch Anzucht aus Mäusen gewonnen wurden. Hierbei bindet humanes Anti-Toxoplasma Immunglobulin an die auf den Objektträgern gebundenen Toxoplasmen. Um den IgG-Titer des zu untersuchenden Serums genau zu bestimmen, verwendet man ein standardisiertes Kontrollserum namens Toxotrol F. Dieses muss mit dem zu untersuchenden Serum bis zu einer geometrischen Verdünnungsreihe von 1/400 reagieren, um den „Toxo-Spot IF“ anwenden zu können. Für das standardisierte Kontrollserum Toxotrol F werden Titerstufen von 10 IU/ml und 300 IU/ml durch Verdünnung hergestellt. Durch im Test vorbestimmte Schritte werden Verdünnungsreihen des Serums hergestellt, welche gegen eine Konjugatkontrolle (PBS) auf die verschiedenen Objektträger aufgetragen werden. Die Objektträger werden nun für 30 min. bei 35-39 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und

anschließend zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und getrocknet. Gebundenes IgG wird anschließend durch ein Fluoreszein-markiertes anti-human Immunglobulin sichtbar gemacht. Hierbei wird Fluoline H in PBS mit Evans Blau 1/10.000 verdünnt. Jedes Feld wird mit 20 µl Fluoline-Gebrauchslösung benetzt und für 30 min. bei 35-39 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger werden erneut zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, in ein aqua dest. Bad getaucht und getrocknet. Anschließend wird unter dem Fluoreszenzmikroskop abgelesen. Im Falle einer positiven Reaktion wird eine grüne Fluoreszenz gesehen, während die Konjugatkontrolle rot erscheinen muss, da die Toxoplasmen in Anwesenheit von Evans Blau dunkelrot erscheinen. Im Falle einer positiven Fluoreszenz in einer oder beiden Verdünnungen ist die Anwesenheit von Toxoplasma-IgG-Antikörpern nachgewiesen. Der Screeningtest muss nun durch eine quantitative Bestimmung beispielsweise mittels „LIAISON Toxo IgM“ ergänzt werden.

3.3.2 Anti-Toxoplasma gondii IgM Capture-Test (LIAISON Toxo IgM)

Der in dieser Arbeit verwendete „LIAISON Toxo IgM“ (REF 310710) wurde nach positivem Ergebnis im indirekten Immunofluoreszenz Test (IFT) zur quantitativen Analyse angeschlossen. Der verwendete Antikörper Capture-Test beruht auf dem Prinzip der Chemilumineszenz. Hierbei wird das gegen humanes IgM gerichtete IgG (Maus, monoklonal) verwendet um Magnetpartikel (Festphase) zu beschichten sowie ein Antikörper (Maus, monoklonal) gegen das TgSAG 1-Oberflächenantigen, der mit einem Isoluminal-Derivat verbunden ist (Isoluminal-Antikörper-Derivat). Während der ersten Inkubation binden sich hierbei die in den Proben vorhandenen IgM-Antikörper an die Festphase. Während der zweiten Inkubation reagiert das Konjugat mit dem vorher zugefügten *T.gondii*- Antigen, wobei der so gebildete Immunkomplex mit den an die Festphase bereits gebundenen IgM-Antikörpern reagiert. Nach jeder Inkubation wird ungebundenes Material durch einen Waschzyklus eliminiert. Durch Zugabe der Starterreagenzien wird eine Lichtreaktion (Chemilumineszenz) initiiert. Hierbei wird das Lichtsignal, welches der Menge an Isoluminol-Antikörper-Konjugaten entspricht, mittels Photomultiplier in relativen Lichteinheiten gemessen und ist zur Konzentration der Anti-*Toxoplasma gondii* IgM-Antikörper proportional.

3.3.3 “Immunosorbent Agglutinations Assay” (TOXO-IgM-ISAGA)

Der in dieser Arbeit verwendete „Immunosorbent Agglutination Assay“ namens „TOXOTOOL M-1“ wurde nach Herstellerangaben angewendet und dient dem Nachweis

spezifischer IgM-Antikörper gegen *T. gondii*. Hierbei werden Rundboden-Mikrotiterplatten verwendet auf deren Boden sich immobilisierte anti-human-IgM-Antikörper befinden. Die Rundboden-Mikrotiterplatten werden mit vorverdünntem Patientenserum benetzt, mit einem Deckel abgedeckt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Hierbei binden die im Serum befindlichen IgM-Antikörper an die auf dem Boden der Mikrotiterplatte vorhandenen, immobilisierten anti-human-IgM-Antikörper. Erfolgt die Testdurchführung bei immunkompetenten Erwachsenen wird das Serum 1:256 vorverdünnt. Wird der Toxo-IgM-ISAGA im Falle einer Immunsuppression oder im Rahmen einer konnatalen Toxoplasmose herangezogen, wird das Serum 1:16 vorverdünnt. Es folgen zwei Waschschrte mit Waschpuffer-Tween-Lösung für jeweils eine Minute sowie vier Waschschrte mit Waschpuffer ohne Tween für jeweils eine Minute, um überschüssige Serumreste zu entfernen. Die 8er-Streifen werden im Folgenden abgesaugt und auf Filterpapier ausgeklopft. Anschließend werden die Kavitäten mit je 100µl *T. gondii* Antigengebrauchslösung benetzt, fünf Minuten geschüttelt und mindestens 18-24 h bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Auswertung erfolgt durch den Vergleich mit den Reaktionsbildern der Kontrollen. Im Falle eines negativen Befundes zeigt sich eine knopfartige, zentrale Sedimentation. Im Falle eines positiven Befundes zeigt sich ein netzartiges Agglutinationsbild ohne Sedimentationsknopf. Die Titerbestimmung erfolgt semi-quantitativ, wobei Seren bei positivem Befund in der 1:256-Verdünnung in mindestens vier Titrationsstufen getestet werden.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Hierbei wird durch alkalische Lyse der Bakterienzellen Plasmid-DNA freigesetzt, wohingegen chromosomale DNA in einem Präzipitat aus Zellwandbestandteilen und Protein eingeschlossen bleibt. In Anwesenheit hoher Konzentrationen eines chaotropen Salzes kann die Plasmid-DNA über spezifische Bindung an die Glasfasermatrix der Trennsäulchen aus der Lösung isoliert werden. Um die gebundene DNA von Salzen, Proteinen oder anderen Verunreinigungen zu befreien, wurde die Matrix zweimal mit Waschpuffer gespült und die

DNA anschließend durch Zugabe von 100 µl Niedrigsalz-Elutions-Puffer von der Säulenmatrix eluiert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.4.1.2 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer *T. gondii*-DNA wurden 3×10^7 Toxoplasmen in 400 µl DNA-Lysepuffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit 100 µg/ml Proteinase K versetzt und ü. N. bei 50°C im Eppendorfschüttler inkubiert. Nach der ü. N.-Inkubation erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 3.4.1.3.). Mit eiskaltem Ethanol (Lagerung bei -20°C) wurde die genomische DNA anschließend aus dem Überstand gefällt und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die gefällte genomische DNA wurde in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

DNA-Lysepuffer

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

3.4.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen wurde das Verfahren der Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Phenol hat die Eigenschaft, Proteine zu denaturieren, die anschließend in der so genannten Interphase zwischen wässriger Nukleinsäurelösung und der organischen Phenolphase ausfallen. Chloroform bewirkt ebenfalls eine Denaturierung der vorliegenden Proteine und stabilisiert die instabile Phasengrenze. Die DNA-haltige Lösung wurde mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform versetzt und nach kurzem Schütteln für 3 Minuten bei 14.196 g und RT abzentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde eine stabile Phasentrennung zwischen der wässrigen und der organischen Phase erzielt. Die obere Phase wurde vorsichtig mit einer Mikropipette abgenommen und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der gewonnene wässrige Überstand wurde bis zum Verlust der Interphase wiederholt extrahiert. Um die gewonnene DNA schließlich von Phenolresten zu reinigen, wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben. Nach kurzem Schütteln erfolgte eine erneute

Zentrifugation für 3 min bei 14.196 g und RT. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die untere Phase verworfen.

3.4.1.4 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Reinigung von dsDNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die zu isolierende Bande unter UV-Licht bei 340 nm sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die dsDNA anschließend mittels des Gel-Extraktion-Kits QIAEX II (Qiagen) aus dem Gel extrahiert. Die Aufreinigung basiert auf einer Bindung der DNA an Silika, wie z.B. Glasmilch unter hohen Salzkonzentrationen. Nach mehrmaligem Waschen mit ethanolischem Puffer wurde die DNA unter Niedrig-Salz-Bedingungen von der Glasmilch-Matrix gelöst. Das Pellet wurde trocken gelassen und anschließend in 25 µl 10 mM TrisCl, pH 8,5 aufgenommen. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 30 sec zentrifugiert und abschließend der Überstand, der die gereinigte DNA enthält, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.4.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Um Gesamt-RNA zu isolieren wurden alle hierfür verwendeten Lösungen mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat-behandeltem (DEPC) und autoklaviertem Wasser angesetzt. Der gesamte Versuchsablauf wurde mit Handschuhen durchgeführt. Die Zellen wurden mittels Guanidinium-Isothiocyanat (GSCN) lysiert und die so gewonnene Gesamt-RNA durch anschließende Ultrazentrifugation des Lysats auf einem Cäsiumchlorid-Dichtekissen gewonnen. Bei der GSCN-Methode wird RNA aufgrund ihrer höheren Schwebedichte in Cäsiumchlorid gegenüber anderen Zellbestandteilen bei der Zentrifugation pelletiert, wohingegen DNA, Lipide und Proteine im Überstand verbleiben. Hierzu wurden 10⁹ zweifach mit PBS gewaschene Toxoplasmen in einem Greiner-Röhrchen mit 4 ml GSCN-Lösung lysiert und die Lösung mit 3 ml DEPC-Wasser versetzt. In einem Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) wurden 3 ml des Cäsiumchlorid-Dichtekissens vorgelegt und dieses anschließend mit Lysat überschichtet. Das präparierte Röhrchen wurde bei 14.196 g für 16 Stunden bei 23°C zentrifugiert und der resultierende Überstand abgesaugt. Das gewonnene RNA-Pellet wurde zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend in 50 µl 10 mM Tris/DEPC-Wasser, pH 7,5 gelöst. Es folgte eine photometrische Konzentrations- und Reinheitsprüfung der RNA.

GSCN-Lösung

Guanidinium-Isothiocyanat 4 M

CsCl-Lösung

Cäsiumchlorid 5,7 M

Natrium-Acetat pH 5,2	20 mM	EDTA pH 8	0,1 M
DTT	0,1 mM	DEPC	0,002 Vol.
N-Laurylsarkosin	0,5%		

3.4.2 cDNA-Synthese

Um bestimmte mRNA-Transkripte in der Gesamt-RNA qualitativ bzw. semiquantitativ nachzuweisen oder aber zu amplifizieren wurde die RNA mittels des „Advantage RT-for-PCR Kits“ (BD Biosciences) in cDNA umgeschrieben.

3.4.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen verhält sich in Lösungen proportional zu der von ihr absorbierten UV-Strahlung und kann mittels UV-Absorptionsspektrometrie photometrisch gemessen werden. Reine Nukleinsäure-Lösungen zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260nm, das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm. Zur Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration wurde die jeweilige Probe in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt und die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren bzw. von Proteinen) im Spektralphotometer (Pharmacia LKB Ultraspec Plus, Pharmacia, Freiburg) ermittelt. Zur Kalibrierung wurde jeweils das entsprechende Lösungsmittel (TE-Puffer oder Aqua dest.) verwendet. Das Verhältnis der ermittelten Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (A260/A280) gibt Auskunft über Verunreinigungen und Konzentrationen der aufgereinigten Nukleinsäuren oder Proteine. Eine Absorption von 1,0 bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm entspricht einem DNA-Gehalt von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA und 40 $\mu\text{g/ml}$ bei einzelsträngiger DNA und RNA. Bei sauberen Präparationen sollte der A260/A280-Quotient Werte zwischen 1,7-2,0 besitzen. Bei Kontaminationen durch Proteine oder Phenol liegt der Quotient deutlich niedriger.

3.4.3 Expression und Reinigung von Proteinen als His₆- Fusionsproteine

3.4.3.1 Expression der His₆-Fusionsproteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Plasmide pET32a(+)-GRA1, pET32a(+)-GRA2, pET32a(+)-GRA6, pET32a(+)-GRA7, pET32a(+)-GRA9, pET32a(+)-MIC5 durch

Einbringen des GRA1-, GRA2-, GRA6-, GRA7-, GRA9-, MIC5-Genfragments in den Expressionsvektor pET32a(+) (Novagen) hergestellt. Nach erfolgter Ligation (s. Kapitel 3.4.4.2) wurde das Insert, bestehend aus jeweiligem Plasmid und dem Vektor pET32a(+) in kompetente *E. coli* vom Stamm DH5 α transformiert. Nach erfolgreicher Klonierung im Stamm DH5 α und sich anschließender Plasmid-Isolation mit erfolgreicher Sequenzanalyse über GATC (s. Kapitel 3.4.5.1) wurde das Plasmid schließlich in den Expressionsstamm BL21 transformiert (s. Kapitel 3.2.6). Der verwendete Vektor pET32a(+) trägt den T7/*lac* Promotor, wodurch die Transkription der gewünschten Proteine kontrolliert werden kann. Die Transkription erfolgt hierbei durch eine T7-RNA-Polymerase, deren zuständiges Gen vom *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert wurde, und durch die Zugabe von 1mM IPTG stimulierbar ist. Die rekombinant hergestellten Proteine tragen alle N-terminal je einen His₆-Tag (0,8kDa), bestehend aus sechs Histidinresten, einen Trx-Tag (12kDa) als auch einen S-Tag (1,7kDa). Dabei ermöglichen diese Tags eine Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätssäulen im Rahmen der denaturierenden Proteinaufreinigung(s. Kapitel 2.3.3.2).

3.4.3.2 Denaturierende Proteinaufreinigung

Die mit Hilfe des *E. coli* Vektors pET32a(+) exprimierten, rekombinanten Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 sind wie bereits erwähnt N-terminal durch sechs Histidine (His₆-Tag) gekennzeichnet. Mittels dieses His₆-Tags sind die Proteine in der Lage spezifisch an Affinitätssäulen über eine Ni-NTA zu binden, womit die Aufreinigung und Elution der Proteine möglich wird.

Für eine Induktion der His₆-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 wurde jeweils eine 5 ml LB-Kultur mit 500 μ l des entsprechenden rekombinanten Expressionsstammes sowie 5 μ l Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am Tag 2 wurde die ü.N.-Kultur in 500 ml LB-Ampicillin-Medium überführt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend mit 1 ml 1M IPTG stimuliert. Durch Induktion mit IPTG wurde die Expression des jeweiligen His₆-Fusionsproteins eingeleitet. Die Kultur wurde anschließend für weitere 2h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Vor der Zugabe von IPTG als auch nach der zweistündigen Inkubation wurde je eine 1ml-Probe für spätere Untersuchungen im SDS-Polyacrylamidgel entnommen und auf Eis oder bei -20°C konserviert. Für die Zellernte wurde der 500ml-Ansatz auf sterile Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 4°C im JA14-Rotor bei 9820 g für 15 min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 15 ml Puffer A resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Wasserbad bei 37°C wieder

aufgetaut und anschließend bei Raumtemperatur für 30 min. auf dem Drehrad inkubiert. Durch die Methode des Einfrierens und Auftauens wird der Aufschluss der Zellen bewirkt. Eine kleine Probe der Kultur wurde für folgende Untersuchungen im SDS-Polyacrylamidgel wie folgt behandelt: Die Probe wurde für 10 min bei 20.442 g im JA20-Rotor abzentrifugiert, der Überstand als Lysat auf Eis oder bei -20°C gelagert, das Pellet wurde in 1 ml Puffer A resuspendiert und ebenfalls auf Eis oder bei -20°C aufbewahrt. Die restliche Kultur wurde auf sterile Beckmann-Becher aufgeteilt, anschließend bei 4°C für 15 min bei 20.442 g im JA20-Rotor zentrifugiert und das Lysat wurde in ein steriles Eppendorf Tube überführt und bei -20°C aufbewahrt. Am Tag 3 wurde das Lysat bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit der mehrfach in Puffer A äquilibrierten Ni-NTA-Agarose versetzt und anschließend auf dem Drehrad für 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reinigung des jeweiligen Fusionsproteins aus dem Zellextrakt erfolgte hierbei durch Affinitätschromatographie. Dazu wurden dem Lysat jeweils 600 µl Ni-NTA-Bindematrix (Qiagen) zugeführt und die Bindung des His₆-Fusionsproteins an die Matrix durch Inkubation auf dem Überkopfschüttler ermöglicht. Das jeweilige Probenlysate wurde schließlich auf eine Säule überführt und der Durchfluss in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Säulenmatrix wurde mit je 10 ml der Waschpuffer A, B und C nacheinander gewaschen und der Durchlauf ebenfalls gesammelt. Auch hier wurde je eine 1ml-Probe vom Durchlauf, den Waschschritten mit Puffer A, B und C für spätere Untersuchungen im SDS-Polyacrylamid-Gel aufbewahrt. Die Elution erfolgte schließlich durch zehnfaches Spülen der Ni-NTA-Matrix mit je 500 µl Puffer E. Die Eluate wurden hierbei in 1,5 ml Reaktionsgefäßen als 500µl Aliquots aufgefangen. Nach der Färbung der Proteine in Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau, wurden die Eluate, die ein starkes Signal zeigten, vereint, um die gewünschten Proteine nach erfolgter Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop in Westernblotanalysen einzusetzen.

Puffer A: 6 M Guanidinhydrochlorid
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
pH:8,0

Puffer C: 8 M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
pH:6,3

Puffer B: 8 M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
pH:8,0

Puffer E: 8 M Harnstoff
0,1 M NaH₂PO₄
0,01 M Tris/HCl
0,25 M Imidazol

3.4.3.3 Fällung der denaturierten Proben für den Gellauf

Zur Fällung der Proteine wurden je 50 µl des Eluats mit 350 µl PBS und 100 µl TCA 50% versetzt und auf Trockeneis gelagert. Die Proben wurden anschließend schonend bei RT aufgetaut und bei 4°C für 15 min. bei 15.288 g abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol resuspendiert und für 15 min, 4°C bei 15.288 g erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach Trocknung bei RT in 40 µl PBS aufgenommen. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde der Ansatz mit je 10 µl 5-fach SDS-Probenpuffer versetzt.

3.4.4 Enzymatische Reaktionen

3.4.4.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung doppelsträngiger DNA-Moleküle wurde das Verfahren der DNA-Restriktion eingesetzt. Hierbei spalten Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch Phosphodiesterbindungen von doppelsträngigen DNA-Molekülen, wobei die Erkennungssequenz für jede verwendete Endonuklease spezifisch ist. Ein Einsatz der Restriktionsendonukleasen zur Spaltung von Plasmid- bzw. Gesamt-DNA erfolgte entsprechend der Empfehlungen des Herstellers. Der DNA-Ansatz wurde mit dem spezifischen Restriktionsenzym sowie dem entsprechenden Puffer versetzt und mit aqua dest. auf 1U/µg DNA eingestellt. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte für BglI und BamHI für 2h bei 37°C oder aber im Falle der „fast digest“-Enzyme für 20 min bei 37°C. Durch Hitzedenaturierung bei 80°C für 10 min und zusätzliche Zugabe von Gelladepuffer wurde die Restriktion gestoppt. Nach der Restriktion weisen DNA-Fragmente komplementäre, überhängende („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“) auf, welche im Rahmen der Ligation durch eine DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden werden. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde anschließend über Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.4.6.1) analysiert.

3.4.4.2 Ligation von DNA

Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA zu einem rekombinanten Plasmid erfolgte durch die ATP- und Mg²⁺-abhängige T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim), welche Bindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- sowie 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle katalysiert. Für eine effiziente Ligationsreaktion wurden die DNA-Konzentrationen von Vektor- und Insert-DNA photometrisch bestimmt und bei einem

Gesamtvolumen des Ligationsansatzes von 15 µl in einem molaren Verhältnis von 1:2 – 1:4 eingesetzt. Pro Ligationsansatz wurden zudem 1-1,5 µl Ligationspuffer (10 x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (60 U/µl) zugefügt, das Volumen mit H₂O aufgefüllt und der Ansatz für 15-45 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der Ligationsansatz ohne weitere Behandlung zur Transformation (Kapitel 3.2.6) eingesetzt.

3.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein Verfahren zur *in vitro*-Amplifizierung eines spezifischen Gen-Fragments definierter Länge und Sequenz. Das Prinzip beruht auf der Vervielfältigung einer Gensequenz, welche von speziellen Oligonukleotiden eingegrenzt wird. Voraussetzung für eine PCR ist, dass flankierende Bereiche der Zielsequenz („Template“-DNA) bekannt sind (Saiki *et al.*, 1988; Ehrlich *et al.*, 1991). Entsprechende komplementäre Oligonukleotide („Primer“) können synthetisiert werden, die mit der „Template“-DNA hybridisieren. Die Oligonukleotid-„Template“-DNA-Hybridisierung erfolgt dabei anti-parallel an beiden Strängen. Bei der PCR wird durch einen wiederholten Ablauf von Strangtrennung durch Erhitzung, Bindung zweier spezifischer Primer und DNA-Synthese mit hitzestabiler DNA-Polymerase eine exponentielle Synthese von DNA-Molekülen aus Desoxynukleosid-Triphosphaten erreicht. Für Klonierungen wurde die „expand high fidelity“ DNA-Polymerase (aus *Pyranococcus furiosus*) herangezogen, die eine so genannte 3'→5'-Exonuklease-Aktivität („proof-reading“-Funktion) besitzt und dadurch eine geringere Fehlerrate der gewünschten Amplifikate aufweist. Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler dem jeweils passenden Programm unterzogen. Die dabei amplifizierte DNA kann anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.4.6.1) analysiert oder isoliert und für eine Klonierungsreaktion (Kapitel 3.4.5.2) genutzt werden.

Für einen analytischen PCR-Ansatz wurden die folgenden Komponenten verwendet:

<u>50 µl-Standard-Reaktionsansatz:</u>	<u>Standard-Thermoprofil:</u>		
1 µl cDNA	94°C	3min.	
1 µl Primer forward	94°C	30sec.	} 30 Zyklen
1 µl Primer reverse	50-62°C	30sec.	
1 µl dNTP-Mix	72°C	70sec.	
1µl Polymerase "high fidelity"	72°C	7min.	
5 µl Polymerase-Puffer (10 x)	4°C	∞	
ad 50 µl Aqua dest.			

3.4.5.1 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von PCR-Fragmenten und klonierten Vektoren wurden die Proben durch die Firma GATC (Konstanz, Germany) mittels spezifischer Primer und Fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden auf einem ABI 3700 Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) untersucht.

3.4.5.2 Klonierung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte klonieren zu können, nutzt man Restriktionsschnittstellen, die in „Primer“-Sequenzen der DNA eingefügt werden. Hierfür wurden Oligonukleotide eingesetzt, die an ihren 5'-Enden spezifische Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen besitzen. Bei diesen Erkennungssequenzen handelt es sich im Gegensatz zu den homologen Bereichen um kurze Sequenzbereiche. Die amplifizierten PCR-Produkte werden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in den Expressionsvektor pET32a(+) inseriert, der zuvor mit gleichen Endonukleasen behandelt wurde.

3.4.6 Gelelektrophoretische Analysen

3.4.6.1 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Das Zucker-Phosphat-Gerüst von Nukleinsäuren trägt negativ geladene Phosphatgruppen. Die geladenen Moleküle wandern im elektrischen Feld und können demnach im Rahmen der gelelektrischen Analyse aufgetrennt werden.

Hierbei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen DNA-Moleküle in Richtung Anode von der Molekülgröße und der Agarosekonzentration des Gels ab. Um den gewünschten Fragment-Größenbereich besonders effektiv aufzutrennen, kann die Porengröße des Gels durch entsprechende Änderung der Agarosekonzentration (0,5-2,0%) angepasst werden.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde 3g Agarose in 300 ml 0,5% TBE-Puffer aufgekocht, 10µl Ethidiumbromidlösung zugesetzt und die gelöste Agarose in einen Gelschlitten eingegossen. Zusätzlich wurde ein Probenkamm eingespannt um Probenaschen im Gel zu gewährleisten. Nach Erkalten wurde das Gel in eine Laufkammer überführt mit 1 % TBE-Puffer bedeckt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit einem Fünftel des Volumens DNA-Gelladepuffer versetzt und in die Probenaschen überführt. Die Auftrennung erfolgte bei 60-100 Volt. Beim Gellauf

interkaliert Ethidiumbromid in die DNA-Fragmente und kann mittels UV-Licht einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und die zu analysierenden DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden (Gelaufnahmegerät Transilluminator Bio Doc Analyze, Biometra, Göttingen). Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen wurde der „1-kb- Leiter“ als Vergleichsstandard herangezogen.

5 x DNA-Probenpuffer:

Ficoll Typ 400	15 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)

in 5 x TBE Puffer

3.4.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur denaturierenden Aufreinigung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Das Prinzip beruht auf Proteinwanderung im elektrischen Feld, wobei Proteingemische auf diese Weise nach Ladung und Masse aufgetrennt und die molekulare Masse von Proteinen bestimmt werden kann. Durch Erhitzen der Proteine werden diese denaturiert und Natriumdodecylsulfat (englisch: Sodiumdodecylsulfate, SDS) lagert sich an die hydrophoben Bereiche der Proteine an, wodurch eine gleichmäßig negative Ladung entsteht und die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Zusätzlich bewirkt β -Mercaptoethanol eine Reduzierung der vorhandenen Disulfidbrücken, wodurch die Stabilität der Proteine erniedrigt wird und die Proteine in ihre Polypeptid-Untereinheiten zerfallen. Für die SDS-PAGE wird Acrylamid als Trägermaterial eingesetzt, das durch Zugabe von 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) radikalisch auspolymerisiert. Durch N,N'-Methylenbisacrylamid werden die ausgebildeten linearen Polyacrylamidmoleküle miteinander quervernetzt. Beim Gellauf wurden die zu analysierenden Proteine zunächst in einem Sammelgel fokussiert und dann in einem Trenngel aufgetrennt. Vor der Auftrennung im Gel wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 33 Volt über Nacht. Durch Erstellung einer Kalibrierungsgeraden lässt sich die molekulare Masse unbekannter Proteine mit Hilfe mitgeführter Marker wie SeeBlue Plus2 bestimmen. Die Wanderungstrecke der Proteine ist dabei antiproportional zum Logarithmus der Molekularmasse.

In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung des 9,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgels aufgezeigt:

Stammlösung	Sammelgel	Trenngel (9,5 %)
Sammelgelpuffer	2,5 ml	-
Trenngelpuffer	-	5 ml
Acrylamidlösung (30 %)	1 ml	6,3 ml
Aqua dest.	6,5 ml	8,5 ml
SDS (10 %)	100 µl	200 µl
APS (10 %)	150 µl	200 µl
TEMED	15 µl	25 µl

SDS-Probenpuffer:

50 % Glycerin	25 ml
SDS	2 g
β-Mercaptoethanol	5 % (w/v)
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	75 ml
Bromphenolblau	1 Spatelspitze

SDS-Laufpuffer:

Tris-Base	6 g (w/v)
Glycin	28,8 g (w/v)
SDS	1 g (w/v)
Aqua dest.	ad 1000 ml

Sammelgelpuffer:

Tris-Base	60,0 g
Aqua dest. (entgast) ad 1000 ml	
pH 6,8 mit HCl	

Trenngelpuffer:

Tris-Base	181,5 g
Aqua dest. (entgast) ad 1000 ml	
pH 8,8 mit HCl	

Acrylamidlösung:

Rotiphorese Gel 30 (gebrauchsfertige Lösung; 37 Anteile Acrylamid, 1 Anteil 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid; Fa. Roth, Karlsruhe)

Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele

Das 9,5 %-ige Trenngel wurde zunächst bis 2 cm unterhalb des Randes in eine Gelvorrichtung eingegossen und zur Gewährleistung einer ebenen Trennfläche mit n-Butanol benetzt. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde das verwendete n-Butanol verworfen und die Kammer mit Sammelgel aufgefüllt. Ein eingespannter Probenkamm sorgte im Sammelgel für die Ausbildung von Probenaschen zum späteren Beladen des Gels.

3.4.7 Proteinanalytische Methoden

3.4.7.1 Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung im Gel sichtbar gemacht. Zur Färbung wurde das Gel auf einem Kippschüttler für ca. 1 h bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Lösung wurde vorsichtig abgegossen und für eine Wiederverwertung nach Filtrierung gesammelt. Zur Entfernung überschüssiger Farbrückstände wurde das Gel anschließend mit H₂O gespült und die überschüssige Farbe mit Entfärberlösung unter Schwenken entfernt, bis blau gefärbte Proteinbanden im Gel deutlich sichtbar wurden. Anschließend wurden die Gele auf Whatman Papier überführt und im Gelrockner (Amersham Biosciences, Freiburg) für 2 h getrocknet.

Coomassie-Brilliant Blau-Färbelösung:

Coomassie-Brilliant Blau R 250	0,5g
Ethanol	500ml
Essigsäure	100ml
H ₂ O	500ml

Entfärberlösung:

Ethanol	200ml
Essigsäure	74,5ml
H ₂ O	725,5ml

3.4.8 Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse wurden durch die Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine (Kapitel 3.4.6.2) mittels „Semidry-Blotting“ („CarboGlas“, Schleicher & Schüll, Dassel) elektrophoretisch auf eine Protein-bindende Nitrozellulosemembran transferiert.

Im Rahmen der Gelelektrophorese wurden die zuvor mittels denaturierender Proteinaufreinigung (Kapitel 3.4.3.2) gewonnenen und vereinten Proteine in spezifischer Konzentration eingesetzt. Diese betrug für rGRA1, rGRA2, rGRA9 und rMIC5 je 0,6 µg/µl und für rGRA6 und rGRA7 je 0,2 µg/µl. Für rGRA1, rGRA2, rGRA9 und rMIC5 wurden je 2µl und für rGRA6 und rGRA7 je 12 µl unter Nutzung der kommerziell erhältlichen NuPage 10%igen Polyacrylamid-Gele der Firma invitrogen in die Probetaschen pipettiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1%-iger MOPS-Puffer, der in die Elektrophoresekammern eingefüllt wurde, wobei die Auftrennung der Proteine bei einer Spannung von 160 V über einen Zeitraum von einer Stunde erfolgte. Zur Beurteilung der Molekularmasse der spezifischen Proteine wurde SeeBlue2 als Marker mit aufgetragen.

MOPS-Puffer:

50 mM MOPS
50 mM Tris-Base
0,1 % (w/v) SDS
1 mM EDTA
pH 7,7
750 ml H₂O

Nach der Proteinauftrennung wurden drei in NuPage-Puffer getränkte 3 MM'-Whatman-Papiere, die der Größe des Gels entsprachen, auf die mit NuPage-Puffer angefeuchtete Kathodenplatte des „Semidry-Blot“-Gerätes gelegt und das Gel sowie die angefeuchtete Membran luftblasenfrei aufgebracht, um den späteren Proteintransfer nicht zu behindern. Der Ansatz wurde mit sechs in Nupage-Puffer getränkten Filterpapieren abgedeckt und mit dem Anodendeckel des „Semidry“-Gerätes verschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer angelegten Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche über einen Zeitraum von 90 min.

NuPage-Puffer:

50 ml NuPage-Blot-Puffer
200 ml Methanol
750 ml Reinstwasser

Die auf die Nitrozellulosemembran fixierten Proteine konnten weiter immunologisch durch spezifische Antikörper analysiert werden (Kapitel 3.4.9).

3.4.9 Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Die Detektion der auf Nitrozellulosemembran fixierten Proteine (Kapitel 3.4.8) erfolgte unter Verwendung spezifischer Primärantikörper und Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper. Hierbei wurden unspezifische Antikörper-Bindestellen auf der Membran mittels Blocklösung (5 %-iges fettfreies Milchpulver in PBS gelöst) abgesättigt. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.

3.4.9.1 Verwendung von Peroxidase-gekoppelten Sekundär- Antikörpern

Die im Rahmen der denaturierenden Proteinaufreinigung (Kapitel 3.4.3.2) gewonnenen rekombinant hergestellten Proteine wurden nach Transfer auf einen Nitrozellulosemembran (Kapitel 3.4.8) und anschließender Absättigung unspezifischer AK-Bindestellen mittels spezifischer Primär-Antikörper (anti-His₆-AK, als auch mit

spezifischen anti-*Tg*-Antikörpern) immunchemisch untersucht. Die Primär-Antikörper wurden hierbei in einer Konzentration von 1:1000 mit 0,5%-iger Milchpulver-PBS-Blocklösung versetzt und für mind. eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit Waschlösung (500 ml PBS mit 1000 µl Tween) gewaschen. Als Sekundär-Antikörper wurden hierbei spezifische Peroxidase-gekoppelte-Enzyme verwendet, wobei durch die Peroxidase das verwendete Chemilumineszenz-Substrat umgewandelt wird und die daraus resultierende Lichtemission schließlich mit einem Röntgenfilm (Kodak) detektiert werden kann. Die Immunodetektion erfolgte mit dem „Enhanced Chemiluminescence (ECL)“-System entsprechend der Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech). Die Expositionszeit erwies sich dabei abhängig von der Signalstärke und verlief in einem Zeitraum von 5 Sekunden bis 3 Minuten. Im Anschluss wurde der Röntgenfilm mit Hilfe der Agfa-Entwicklermaschine entwickelt und die detektierten Proteinbanden durch Vergleich mit der Markerbande auf der Nitrozellulosemembran ausgewertet.

3.4.9.2 Verwendung von Alkalischer-Phosphatase-gekoppelten Sekundär-

Antikörpern

Als Primär-Antikörper wurden Seren von Personen mit verschiedenem Infektionsstatus hinsichtlich einer Toxoplasmose verwendet und im Verhältnis 1:100 mit Blocklösung (0,5%iges fettfreies Milchpulver in PBS gelöst) versetzt. Die Nitrozellulosemembranen wurden nach Proteintransfer anschließend mit den Primär-Antikörpern ü. N. im Kühlraum unter Schütteln inkubiert. Als Sekundär-Antikörper wurden Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper mit Blocklösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Alle Ansätze wurden für jeweils mindestens 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Im Anschluss an jede Inkubation wurde die Membran dreimal für 15 min mit PBS gewaschen.

Zur Detektion spielt das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym Alkalische Phosphatase die entscheidende Rolle. Im Falle der Alkalischen Phosphatase wurden die gewaschenen Membranen mit Alkalische Phosphatase Puffer (je 10 ml) unter Zugabe von je 33 µl BCIP und je 44 µl NBT nach Herstellerangaben (Fermentas, St. Leon-Roth) für 5 min. bei Tageslicht inkubiert, hierbei kam es zu einem violetten Farbumschlag im Falle einer positiven Detektion.

3.4.9.3 Trichloressigsäure-Präzipitation von Proteinen

Fällt man Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) kommt es zu einer Degradierung der entsprechenden Proteine, wobei deren enzymatische Aktivitäten zumeist verloren gehen, ihre Antigeneigenschaften jedoch überwiegend erhalten bleiben. Somit dient die TCA-Behandlung von Proteinen deren Konzentration und sie sind anschließend weiterhin für Western Blot-Analysen verwendbar.

Für die TCA-Fällung werden 50 µl der Proteinprobe mit 350 µl PBS und abschließend 100 µl 50%-ige Trichloressigsäure (Endkonzentration 10 % TCA) versetzt und anschließend für 10 min auf Trockeneis gelagert. Die gefällten Proteinproben wurden anschließend schonend bei RT aufgetaut und die Proteine durch eine 15-minütige Zentrifugation gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 23.708 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumluft getrocknet.

Das gewonnene Pellet wurde in 20 µl PBS gelöst und mit 10 µl 5-fach SDS-Puffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben anschließend für 5 min bei 100°C inkubiert und für 2 min bei 14.196 g abzentrifugiert. Die Analyse der gereinigten Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 3.4.6.2)

4. Ergebnisse

Nach Invasion in eine Wirtszelle werden vom Parasiten *T. gondii* GRA-Proteine *in vivo* während der gesamten intrazellulären Entwicklung des Parasiten in kleinen Mengen sezerniert. Aufgrund der kontinuierlichen Ausschüttung können GRA-Proteine ständig vom Immunsystem erkannt werden. In aktuellen diagnostischen Nachweisverfahren werden aufgereinigte Proteine wie ROP1, MAG1, SAG1, GRA7 und GRA8 verwendet, um eine Infektion mit *T. gondii* mittels Immunoblot nachzuweisen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin weitere spezifische rekombinante GRA-Proteine von *T. gondii* herzustellen, um zu analysieren, ob den GRA-Proteinen von *T. gondii* eine unterschiedliche Immunität im Verlauf der Infektion zugeschrieben werden kann. Ziel war es darüber hinaus erste Daten unter Nutzung verschiedener Patientenserum zu erheben, um eine Aussage treffen zu können, welche GRA-Proteine von *T. gondii* besonders geeignet sind eine akute oder chronische Toxoplasmose zu diagnostizieren.

4.1 Herstellung der rekombinanten Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9, rMIC5 mittels Insertion eines cDNA-Konstrukts in den Expressionsvektor pET32a(+)

Sekretorische GRA-Antigene von *T. gondii* werden als immundominante Antigene betrachtet, die den Hauptanteil der „excreted-secreted antigens (ESA)“ von *T. gondii* bilden. Sie werden darüber hinaus während des gesamten Entwicklungszyklus von *T. gondii* kontinuierlich sezerniert und wirken daher über einen längeren Zeitraum stark immunogen im Gegensatz zu den ROP und MIC-Proteine, die überwiegend zum Zeitpunkt der Invasion des Parasiten in die Wirtszelle sezerniert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die GRA-Proteine als Antigene eingesetzt, um die spezifische Antikörper-Produktion *T. gondii*-infizierter Patienten zu analysieren. Für die geplanten serologischen Analysen wurden die Antigene GRA1, GRA2, GRA6, GRA7, GRA9 und MIC5 in Volllänge rekombinant hergestellt.

Zur Herstellung der rekombinanten Antigene wurde zunächst die aus RH-*Toxoplasmen* gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion wurde auf Basis der cDNA die Sequenz des entsprechenden Proteins GRA1, GRA2, GRA6, GRA7, GRA9 sowie MIC5 amplifiziert. Hierbei wurden für jedes cDNA-Konstrukt Gen-spezifische Primer genutzt, z.B. GRA1forward-/GRA1reverse- Primer zur Herstellung des GRA1-cDNA-Konstrukts (s. Kapitel 3.1.2.1). Der jeweilige Primer flankiert den ausgewählten Amplifikationsbereich des jeweiligen cDNA-Konstrukts und fügt Schnittstellen am 5'- und

3'-Ende der PCR-Fragmente für Restriktionsendonukleasen an. Über diese Schnittstellen können die PCR-Fragmente in die ‚Multiple Cloning Site‘ (MCS) des *E. coli*-Expressionsvektors pET32a(+) eingefügt werden.

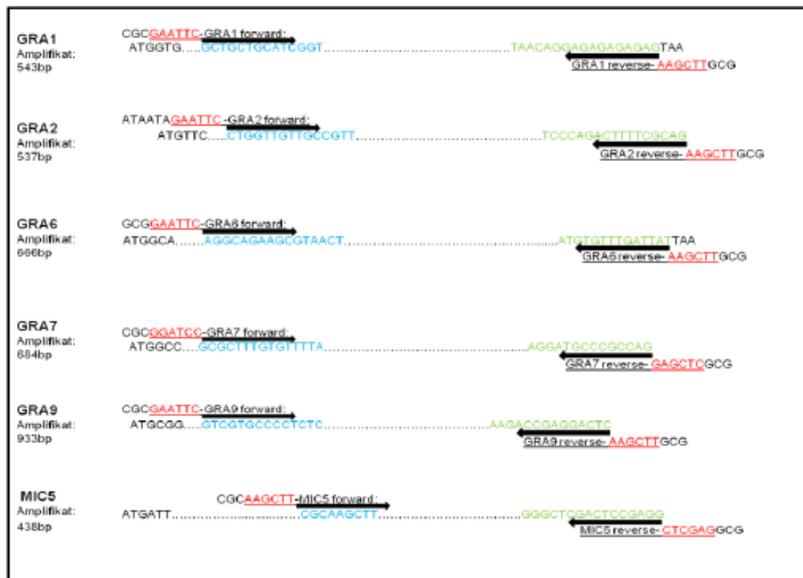


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Nukleinsäuresequenz der GRA-Proteine mit der jeweiligen vom Primer flankierten Sequenz. Primer forward (flankierte Sequenz: blau), Primer reverse (flankierte Sequenz: grün), enzymatische Schnittstellen (rot)

Die erfolgreiche Amplifikation des GRA1 (543bp), GRA2 (537bp), GRA6 (666bp), GRA7 (684bp), GRA9 (933bp) sowie des MIC5 (438bp) konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Abbildung 6) bestätigt werden. Hierzu wurden die Amplifikate aus dem Gel eluiert und über das QIAEXII Kit aufgereinigt.

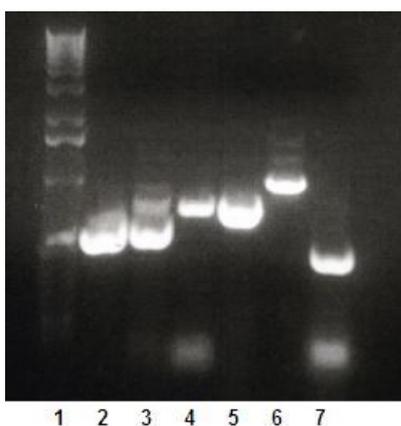


Abbildung 6: Amplifikation der cDNA-Konstrukte mittels Agarose-Gelelektrophorese: Marker 1Kb DNA ladder(line1), GRA1(line 2), GRA2(line3), GRA6(line4), GRA7(line5), GRA9(line6), MIC5(line7)

Die aufgereinigten DNA-Fragmente konnten anschließend der Restriktion zugeführt werden. Um eine gerichtete Klonierung des GRA1-, GRA2-, GRA6-, GRA7-, GRA9 und MIC5-Gens in den Expressionsvektor pET32a(+) zu gewährleisten, wurden über die entsprechenden PCR-Primer spezielle Schnittstellen für die Restriktionsenzyme geschaffen. So lieferten die Primer GRA1-forward, GRA2-forward, GRA6-forward, sowie GRA9-forward die Schnittstelle „GAATTC“ für das Restriktionsenzym *EcoRI*. Die Primer GRA1-reverse, GRA2-reverse, GRA6-reverse und GRA9-reverse sowie MIC5-forward kodierten für die Schnittstelle „AAGCTT“ des Restriktionsenzym *HindIII*. Der Primer GRA7-forward lieferte die Schnittstelle „GGATCC“ für das Restriktionsenzym *BamHI*, GRA7-reverse beinhaltet die Information „GAGCTC“ für das Enzym *SacI* und der Primer MIC5-reverse kodiert mit „CTCGAG“ für das Restriktionsenzym *XhoI*.

Die aufgereinigten Amplifikate sowie der Vektor pET32a(+) wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, über einen erneuten Gellauf aufgereinigt und in die Ligation eingesetzt.

Die Ligation des Expressionsvektors pET32a(+) mit dem jeweiligen GRA1-, GRA2-, GRA6- bzw. GRA9-Fragments erfolgte über *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen. Die Insertion von GRA7 erfolgte über die Schnittstellen *BamHI* und *SacI* und MIC5 wurde über die Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* in den Vektor pET32a(+) eingebracht. Das jeweilige DNA-Fragment wurde dabei im Verhältnis 2:1-4:1 Inset:Vektor in die Ligation eingesetzt. Nach erfolgreicher Ligation wurden die Konstrukte pET32a(+)-GRA1-His, pET32a(+)-GRA2-His, pET32a(+)-GRA6-His, pET32a(+)-GRA7-His, pET32a(+)-GRA9-His, sowie die pET32a(+)-MIC5-His mittels der Hitzeschockmethode in den Bakterienstamm *E. coli DH5α* eingebracht und die Transformanten auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausselektioniert. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektor pET32a(+) weist eine Ampicillinresistenz auf, wodurch selektiv nur die Klone mit Ampicillinresistenz Kolonien ausbilden konnten. Die angewachsenen Klone wurden durch PCR-Analyse und Restriktionsverdau überprüft. Für die Restriktionsanalyse der konstruierten Plasmide wurden Restriktionsenzyme für die einzelnen Analysen herangezogen: GRA1 wurde mit Styl „fast digest“, PVUI „fast digest“, GRA2 mit BGLI, PVUII „fast digest“, GRA6 mit *XhoI* „fast digest“, Styl „fast digest“ geschnitten. GRA7 wurde mit *EcoRI*/*HindIII* „fast digest“, GRA9 mit *XhoI* „fast digest“ und MIC5 mit *BamHI* „fast digest“ enzymatisch behandelt.

Die Abbildung 7 zeigt beispielhaft den Restriktionsverdau des konstruierten pET32a(+)-GRA2-His-Plasmids mit dem Restriktionsenzym *PVUII* „fast digest“

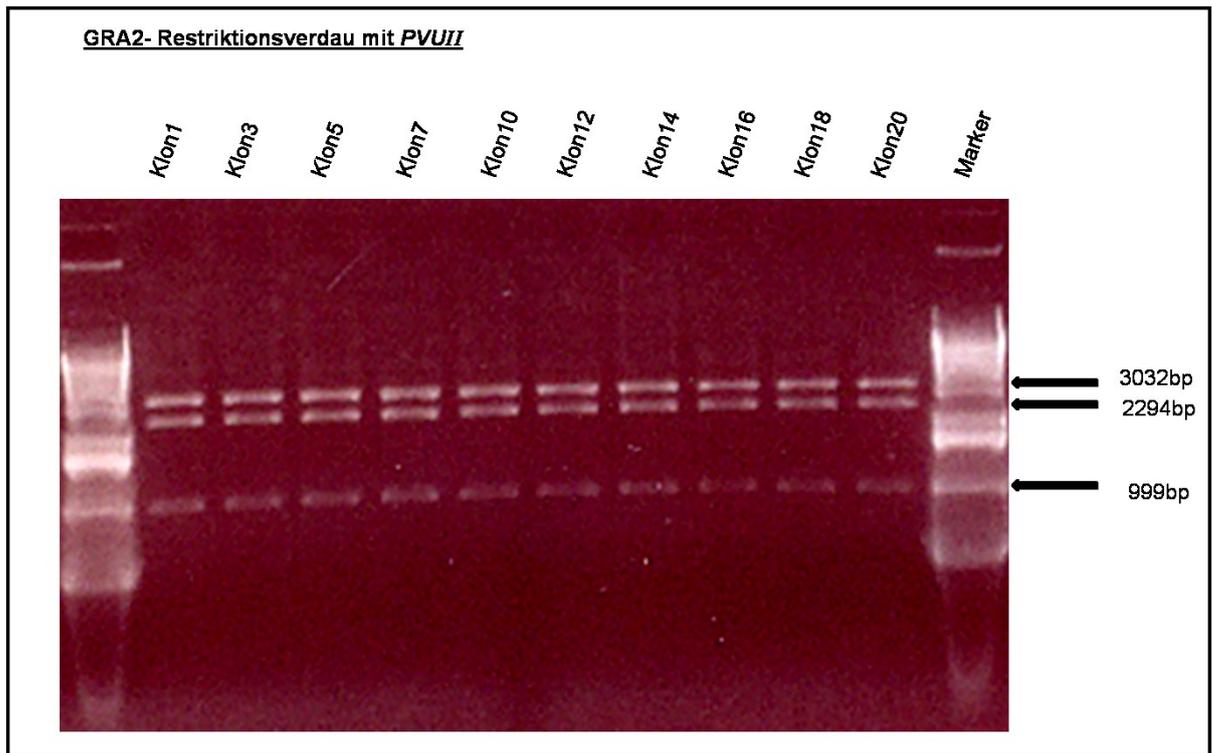


Abbildung 7: Restriktionsverdau des pET32a(+)-GRA2-His-Konstrukts mittels des „fast digest“ Restriktionsenzym *PVU*II. Zehn Klone des pET32a(+)-GRA2-His-Plasmids wurde mit *PVU*II behandelt. Die erwarteten Fragmentgrößen von 999 bp, 2294 bp und 3032 bp konnten in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden

Insgesamt wurden zehn Klone des pET32a(+)-GRA2-His-Konstrukts nach selektivem Anwachsen auf Ampicillinagar für die Restriktionsanalyse herangezogen. Die Plasmide durch Minipräparation isoliert, mit dem Enzym *PVU*II „fast digest“ geschnitten und in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Falle von pET32a(+)-GRA2-His konnten spezifische Banden auf Höhe von 3032 bp, 2294 bp und 999 bp detektiert werden. Die Banden entsprachen damit den theoretisch ermittelten Fragmentgrößen wodurch die erfolgreiche Ligation und Integration des pET32a(+)-GRA2-His-Konstrukts in den Expressionsstamm DH5 α bestätigt werden konnte. Bei nicht erfolgter Ligation wäre ein Bandenmuster von Fragmentgrößen 4808 bp, 999 bp und 93 bp zu erwarten gewesen, welches dem Vektor pET32a(+) mit *PVU*II geschnitten entspricht. Desweiteren konnte die erfolgreiche Ligation des pET32a(+)-GRA1-His-Fusionskonstrukts durch den Restriktionsverdau mit *Sty*I (erwartete Fragmentgrößen von 5745 bp, 564 bp und 121 bp) als auch *PVU*I (erwartete Fragmentgrößen 5054 bp und 1376 bp) mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die Analyse von pET32a(+)-GRA6-His mit den Enzymen *Xho*I bzw. *Sty*I zeigte die erwarteten Fragmentgrößen von 6202 bp, 351 bp bzw. von 5745 bp, 564 bp, 244 bp. Die Restriktionsanalyse des pET32a(+)-GRA7-His-Fusionskonstrukts mittels *Eco*RI/*Hind*III (erwartete Fragmentgrößen von 6258 bp, 246 bp und 74 bp) konnte ebenfalls erfolgreich über die Gelelektrophorese bestätigt werden. Darüber hinaus konnte die erfolgreiche

Ligation des pET32a(+)-GRA9-His-Fusionskonstrukts mit *XhoI* (erwartete Fragmentgrößen 6244 bp, 477 bp, 99 bp) und die des pET32a(+)-MIC5-His-Fusionskonstrukts mit dem Restriktionsenzym *BamHI* (erwartete Fragmentgrößen von 5992 bp, 343 bp) erfolgreich nachgewiesen werden.

Die über Restriktionanalyse und zusätzlicher Sequenzanalyse, seitens der Firma GATC (Konstanz), ausgetesteten Konstrukte wurden zur Überexpression in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Der Expressionsstamm BL21 (DE3) steht unter T7-Polymerase-Kontrolle. Durch ein lac-Repressor-Protein kann die T7-Polymerase nicht binden und die Expression des Plasmids wird unterbunden. Dieser Stamm kann nur gezielt durch Induktion mit IPTG das Zielprotein produzieren.

4.2 Denaturierende Aufreinigung der verschiedenen Proteine mittels His₆-Tag über SDS-Gele

Nach Transformation der Plasmidkonstrukte in den Expressionsstamm BL21(DE3), wurde eine Vorkultur ü.N. in LB-Ampicillin-Medium inkubiert. Durch Zugabe von IPTG zu den Stämmen *E. coli* BL21 – pET32a(+)-GRA1, *E. coli* BL21 – pET32a(+)-GRA2, -GRA6, -GRA7, -GRA9 und *E. coli* BL21 – pET32a(+)-MIC5 wurde die Expression der rekombinanten Proteine GRA1-His₆, GRA2-His₆, GRA6-His₆, GRA7-His₆, GRA9-His₆ MIC5-His₆ induziert. Die Isolierung der rGRA-His₆- bzw. des rMIC5-His₆-Fusionsproteine aus dem Lysat erfolgte über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die in *E. coli* rekombinant exprimierten Proteine besitzen einen über pET32a(+) vermittelten Tag, der sich aus einem Trx-Tag (12 kDa), einem S-Tag (1,7 kDa) und einem His₆-Tag (4,8 kDa) zusammensetzt. Über den His₆-Tag, der aus sechs aneinandergereihten Histidinresten besteht, erfolgte die Aufreinigung der Proteine durch Anlagerung an eine Ni-NTA-Matrix. Der His₆-Tag des rekombinanten Proteins bindet an die Ni-NTA-Matrix und nach mehreren Waschschritten, die das Protein von Verunreinigungen befreien, konnte mittels des verwendeten Elutionspuffers das gereinigte, spezifische Protein in zehn Elutionsschritten von der Matrix gelöst werden. Die isolierten rekombinanten Proteine rGRA1-His₆, rGRA2-His₆, rGRA6-His₆, rGRA7-His₆, rGRA9-His₆ und rMIC5-His₆ wurden anschließend zum Nachweis der Proteinexpression über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Gele mit Comassie Brilliant Blau gefärbt, wodurch deutliche Banden auf der erwarteten Höhe für die gewünschten Proteine erzielt werden konnten. Abbildung 8 a)-c) zeigt das Ergebnis der His₆-Proteinisolierung nach SDS-Page und Comassie Brilliant Blau-Färbung. Exemplarisch ist das Ergebnis einer Antigenaufreinigung von rGRA1-His₆, rGRA2-His₆, rGRA7-His₆ und rMIC5-His₆ dargestellt. In den Spalten A-C sind Proben der

einzelnen Reinigungsschritte aufgetragen. Die Spalten 1-10 zeigen die einzelnen Elutionsfraktionen.

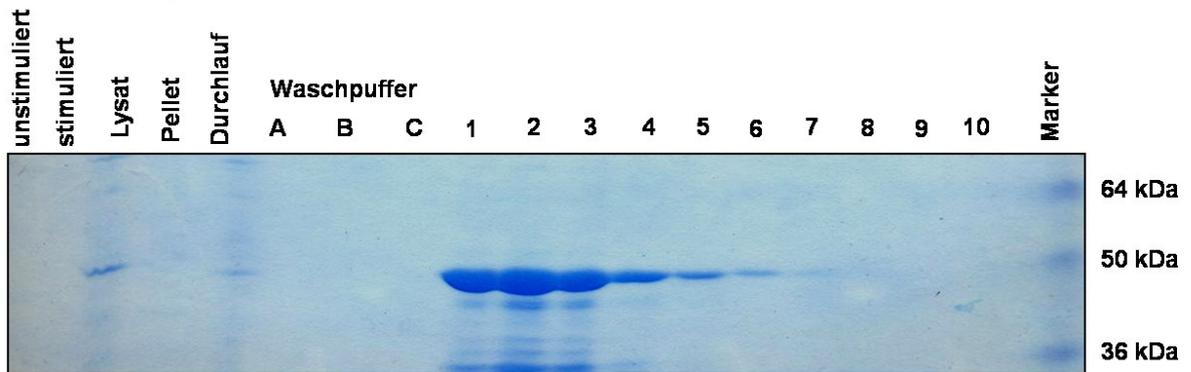
a)

rGRA1-His₆: 40kDa



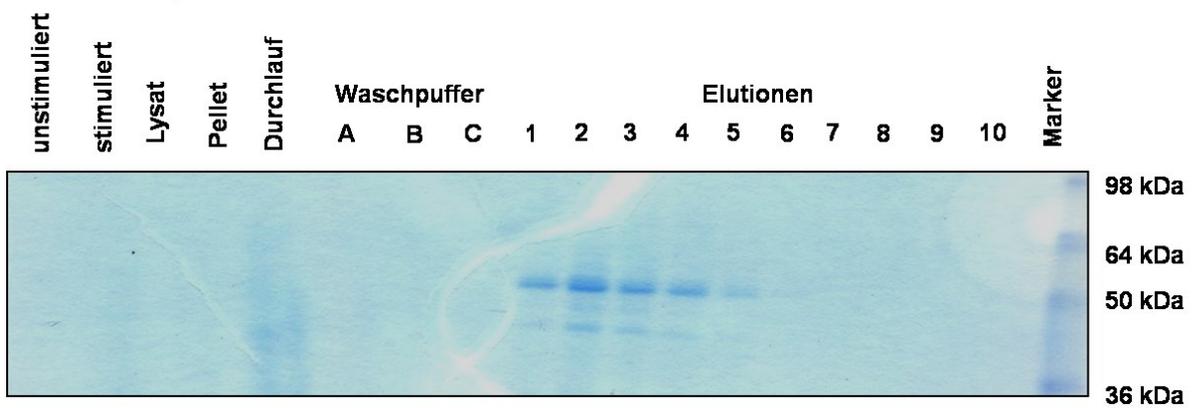
b)

rGRA2-His₆: 45kDa



c)

rGRA7-His₆: 47kDa



d)

rMIC5-His₆: 28kDa

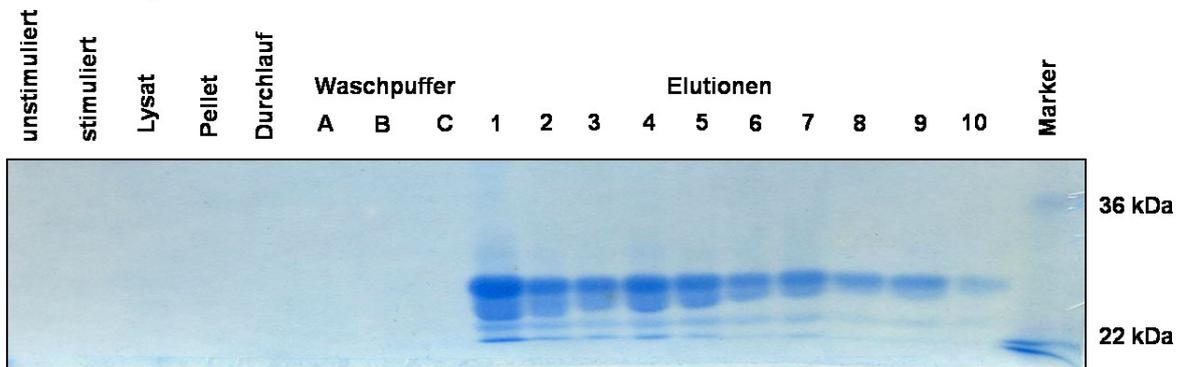


Abbildung 8: Darstellung der denaturierenden Proteinaufreinigung beispielhaft für die Proteine a) rGRA1-His₆ (40 kDa), b) rGRA2-His₆ (45 kDa), c) rGRA7-His₆ (47 kDa) und d) rMIC5-His₆ (28 kDa). Die Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau im Gel angefärbt. Hierbei tragen die Proteine einen Tag, der sich aus einem Trx-, einem S- sowie einem His₆-Tag zusammensetzt.

Abbildung 8 b) zeigt die denaturierende Proteinaufreinigung des rGRA2-His₆-Proteins nach Überexpression in dem *E. coli*- Expressionsstamm BL21 (DE3). Die erfolgreiche Expression des Proteins konnte in den Spalten 1-6 anhand der Elutionen nachgewiesen werden. Das Protein GRA2 hat generell eine Größe von 28kDa. Das rGRA2-His₆-Protein zeigt nach erfolgreicher Ligation und anschließender Expression eine erwartete Größe von 45kDa, die sich durch den zusätzlich an das Protein angehängenen Tag erklärt, und konnte in ausreichender Menge isoliert werden. Die Elutionen der einzelnen denaturierenden Aufreinigungen wurden zum nachfolgenden Einsatz in Western-Blot-Analysen gepoolt (für GRA2 beispielsweise die Eluate 1-4), die Proteinkonzentration mittels Nano-Drop ermittelt und die Proben bei -20°C gelagert.

4.2.1 Analyse der isolierten rGRA-His₆- sowie des rMIC5- His₆-Fusionsproteine im Western-Blot

Die rekombinant hergestellten Proteine zeichnen sich durch einen His₆-Tag aus, wodurch sich ihre Laufgröße von der der natürlich vorkommenden Proteine GRA1, GRA2, GRA6, GRA7, GRA9 als auch MIC5 deutlich unterscheidet. Zusätzlich zum SDS-Polyacrylamid-Gelnachweis wurde die erfolgreiche Isolierung der rGRA-His₆- sowie des rMIC5-His₆-Fusionsproteins im Immuno-Blot mittels des anti-His₆-Antikörpers sowie spezifischen GRA-Antikörpern überprüft. Dafür wurden jeweils drei Elutionsfraktionen von *E. coli* BL21-pET32a(+)-GRA1-His₆⁻, BL21-pET32a(+)-GRA2-His₆⁻, BL21-pET32a(+)-GRA6-His₆⁻,

BL21-pET32a(+)-GRA7-His₆-, *BL21*-pET32a(+)-GRA9-His₆- und *BL21*-pET32a(+)-MIC5-His₆-Proteins über SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Anti-His₆- bzw. GRA-Antikörpern immunologisch analysiert. Als Kontrolle wurde isoliertes *T. gondii* Lysat mit aufgetragen. Abbildung 9 zeigt den Nachweis des aufgereinigten rGRA1-His₆-Proteins auf einer Höhe von 40 kD in den Elutionen 1-3. Ebenso konnte das rGRA2-His₆-Protein auf einer Höhe von 45 kD, das rGRA6-His₆-Proteins auf einer Höhe von 49 kD, das rGRA7-His₆-Proteins auf einer Höhe von 47 kD, das rGRA9-His₆-Proteins auf einer Höhe von 58 kD und das rMIC5-His₆-Protein auf einer Höhe von 28 kD jeweils in den Elutionen 1-3 detektiert werden. Die Detektion des His₆-Tags durch den monoklonalen anti-His₆-Antikörper bestätigt die erfolgreiche Isolation der His₆-getaggtten Proteine. Dagegen konnte im *T. gondii*-Lysat erwartungsgemäß keine Bande detektiert werden, da die Proteine im Lysat keinen His₆-Tag tragen. Das *T.gondii*-Lysat dient somit als Negativkontrolle.

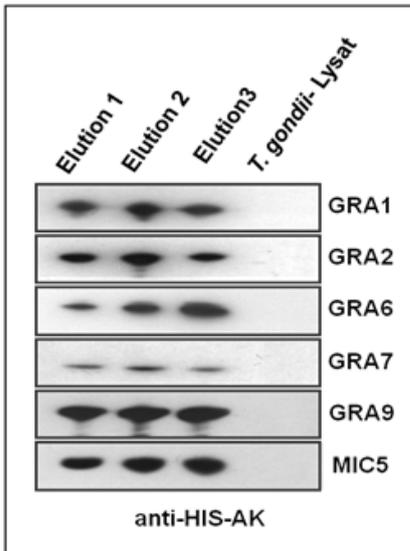


Abbildung 9: Nachweis der Proteine rGRA1- His₆, rGRA2- His₆, rGRA6- His₆, rGRA7- His₆, rGRA9- His₆ und rMIC5- His₆ in den Elutionen 1-3 nach Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mittels anti-His₆-AK. Als Kontrolle wurde *T. gondii*-Lysat (Spur 4) aufgetragen

Für den direkten Nachweis des rGRA1-His₆-, rGRA2-His₆- und rGRA9-His₆-Konstrukts wurde der in unserer Arbeitsgruppe hergestellte spezifische anti-GRA9-Antikörper sowie die spezifischen anti-GRA1- und anti-GRA2-Antikörper (M-F. Cesbron-Delauw (Grenoble, Frankreich)) herangezogen. Abbildung 10 zeigt den Immunoblot-Nachweis von drei Elutionsfraktionen der rekombinanten GRA1-His₆, GRA2-His₆ und GRA9-His₆-Proteine, als Kontrolle wurde *T. gondii*-Lysat (Spur 4) eingesetzt. Nach Detektion mit den spezifisch gegen diese Proteine gerichteten anti-GRA-Ak konnten das Protein GRA1 erwartungsgemäß auf einer Höhe von 23 kDa nachgewiesen werden. GRA1 konnte auf

entsprechender Höhe ebenfalls im *T. gondii*-Lysat detektiert werden, das in diesem Fall als Positivkontrolle mit aufgetragen wurde. Darüber hinaus konnte das Protein GRA2 sowohl in den Elutionen als auch im *T. gondii*-Lysat mit einer Größe von 28 kDa detektiert werden. Der Nachweis von GRA9 erfolgte in allen vier Spuren mit einer Größe von 41 kDa.

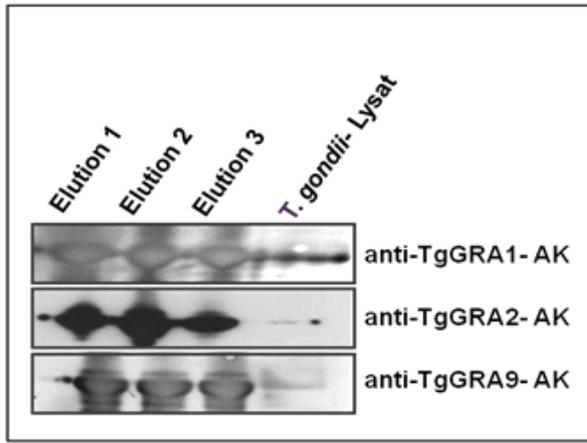


Abbildung 10: Spezifischer Nachweis der Proteine GRA1- His₆, GRA2- His₆, GRA9- His₆ in den Elutionen 1-3 mittels anti-GRA1-, anti-GRA2- und anti-GRA9-Antikörper. Als Positivkontrolle wurde *T. gondii*-Lysat mit aufgetragen

Nach positiver Analyse der isolierten rGRA-His₆-Fusionsproteine wurden die rekombinant hergestellten Proteine für weiterführende Analysen mit Patientenseren eingesetzt.

4.3 Analyse der rekombinanten Proteine als Antigene in Western-Blot-Untersuchungen unter Verwendung von Patientenseren

Nach erfolgreicher Isolierung der rekombinanten GRA-His₆- sowie des rekombinanten MIC5-His₆-Fusionsproteins über Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden die aufgereinigten Proteine rGRA1-His₆, rGRA2-His₆, rGRA6-His₆, rGRA7-His₆, rGRA9-His₆ und rMIC5-His₆ in einem spezifischen Western-Blot Testverfahren als Antigene herangezogen. Da im Rahmen der denaturierenden Proteinaufreinigung die verschiedenen Proteine in unterschiedlichen Konzentrationen isoliert wurden, wurde vor Einsatz der Fusionsproteine im Western-Blot die Proteinmenge für jedes Protein am NanoDrop 1000 Spectrophotometer bestimmt. Die photometrische Bestimmung ergab für die Proteine rGRA1-His₆, rGRA2-His₆, rGRA9-His₆ und rMIC5-His₆ eine Konzentration von ca. 0,6 µg/µl. Die Fusionsproteine rGRA6-His₆ und rGRA7-His₆ wiesen eine Konzentration von ca. 0,1 µg/µl auf. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen wurde in den folgenden Western-Blot-Analysen für rGRA1-His₆, rGRA2-His₆, rGRA9-His₆ und rMIC5-His₆ jeweils 2 µl und für rGRA6-His₆ und rGRA7-His₆ jeweils 12 µl Antigenmenge

standardisiert im Western-Blot eingesetzt. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für serologische Diagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden Seren von Patienten, die Toxoplasmose-negativ, chronisch oder aber akut mit *T. gondii* infiziert waren, zur Verfügung gestellt. Die Blots wurden anschließend mit den verschiedenen Seren inkubiert. Die verwendeten Seren waren bereits durch die Abteilung für serologische Diagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf in serologischen Tests mittels IFT-Titer und ISAGA-Titer näher spezifiziert worden waren. Um Untersucher-„bias“ zu vermeiden, waren die serologischen Ergebnisse bei Einsatz der Seren in den Western-Blot-Analysen dem Untersucher nicht bekannt.

Die verschiedenen Antigene wurden auf Nu-Page 10%ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels „SemiDry-Blotting“ auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit Blocklösung abgesättigt und anschließend mit dem jeweiligen Patienten-Serum ü. N. inkubiert. Zur Reduzierung des Hintergrunds wurde die Membran mehreren Waschschritten unterzogen und anschließend mit dem Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Sekundär-Antikörper anti-IgG, anti-IgM bzw. anti-IgA (s. Kapitel 4.5, 4.6) inkubiert. Durch den Nachweis der Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA sollte der Status einer *T. gondii* Infektion nachgewiesen werden und eine eventuelle Korrelation der Immunglobulinklassen mit dem jeweiligen, tatsächlichen Infektionsstatus und -verlauf verglichen werden.

Um auf Basis der humanen Seren möglichst reine Detektionen zu erzielen, wurde im Rahmen der Arbeit zunächst Peroxidase (POX)-gekoppelte, sowie AP-gekoppelte Sekundär-Antikörper verwendet. Der Nachweis mit POX-gekoppelten Antikörpern führte jedoch zu starken Hintergrundsignalen, die auch durch den Einsatz von verschiedenen Blockierlösungen wie 10-%iges Milchpulver-PBS oder 5%-iges FCS-PBS nicht ausreichend abgeschwächt werden konnten. Aufgrund dieser starken Hintergrundsignale wurde von einem POX-gekoppelten Nachweis abgesehen und die Detektion mittels Alkalischer Phosphatase (AP)-gekoppelten Sekundär-Ak fortgeführt. Die Entwicklung erfolgte standardisiert unter Nutzung von NBT und BCIP für fünf Minuten unter Einwirkung von Tageslicht.

4.3.1 IgG-spezifische Western-Blot-Analysen mit seropositiven und seronegativen Patientenproben

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob der Einsatz der rekombinanten Fusionsproteine als Antigene in Western-Blot-Analysen geeignet ist seropositive von seronegativen Patientenseren zu unterscheiden. Dazu wurden die rekombinanten Fusionsproteine rGRA1-His₆, rGRA2-His₆, rGRA6-His₆, rGRA7-His₆, rGRA9-His₆ und rMIC5-His₆ im NuPage 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde schließlich mit dem Serum eines chronisch mit *T. gondii* infizierten Patienten inkubiert und anschließend mit einem AP-gekoppelten anti-IgG-Sekundärantikörper detektiert. Der in Abbildung 11 dargestellte Immunoblot zeigt, dass das Humanserum des chronisch mit *T. gondii* infizierten Patienten spezifische IgG-Antikörper gegen die Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 sowie rMIC5 enthält.

Als Kontrolle wurde die Analyse mit einem Serum eines *T.gondii*-negativen Patienten durchgeführt, welches in serologischen Untersuchungen keine IgG-Ak gegen die getesteten, spezifischen Toxoplasmen-Proteine aufwies. Wie in Abbildung 11 gezeigt konnten erwartungsgemäß keine spezifischen Banden entsprechend vorhandener IgG-AK gegen rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 sowie rMIC5 detektiert werden, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass dieses Patientenserum keine spezifischen IgG-Antikörper gegen die untersuchten Fusionsproteine enthält.

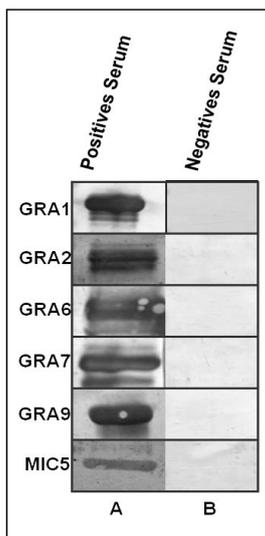


Abbildung 11: Detektion der IgG-Ak gegen die rekombinanten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 sowie rMIC5 unter Verwendung eines *T. gondii*-positiven Patienten-Serums(A) sowie eines *T. gondii*-negativen Patienten-Serums(B) als Primär-Antikörper. Die Proteine wurden in 10% NuPage-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit dem jeweiligen Serum A oder B als Primär-AK sowie dem monoklonalen AP-gekoppelten IgG-Sekundär-AK inkubiert und anschließend mit alkalischer-Phosphatase entwickelt.

Der Nachweis zeigt, dass unter Verwendung der hergestellten rekombinanten GRA1-His₆-, GRA2-His₆-, GRA6-His₆-, GRA7-His₆-, GRA9-His₆-Proteine und des hergestellten rMIC5-His₆-Proteins eine Unterscheidung zwischen Proben von seropositiven und seronegativen Patienten möglich ist.

4.3.2 Untersuchung von Patientenseren im zeitlichen Verlauf der Infektion

Um die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse zu untersuchen, wurden Patientenseren eines Individuums im zeitlichen Verlauf einer *T. gondii*-Infektion analysiert. In Voruntersuchungen der serologischen Diagnostik wies das Serum desselben Individuums im Verlauf unterschiedliche IFT- und ISAGA-Titer auf. Die rekombinant hergestellten Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 wurden im Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde anschließend mit dem jeweiligen Serum des selben Patienten, welches zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion asserviert wurde, inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis mit einem AP-gekoppelten anti-IgG-Sekundärantikörper und es konnten spezifische IgG-Banden unterschiedlicher Intensität detektiert werden, wie in Abbildung 12 dargestellt. Die Probe 1, welche zum frühesten Zeitpunkt der Infektion asserviert wurde, zeigt spezifische IgG-Antikörper gegen die rekombinanten Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9. Die spezifischen IgG-AK gegen rGRA2, rGRA6, rGRA7 als auch rGRA9 konnten ebenfalls in den Proben 2 und 3 detektiert werden. Hierbei wurde Probe 2 ca. zwei Wochen nach der ersten Probe und Probe 3 ca. einen Monat nach der ersten Serumprobe entnommen. Die Intensität der Detektion der spezifischen IgG-AK gegen rGRA2 als auch rGRA7 nimmt hierbei im Verlauf der Infektion ab. Im Falle von rGRA1 konnten spezifische IgG-AK nur in der ersten Probe detektiert werden. Wohingegen keine spezifischen IgG-Antikörper gegen rMIC5 detektiert werden konnten, da diese vom Patienten zu keinem der drei Zeitpunkte gebildet wurden.

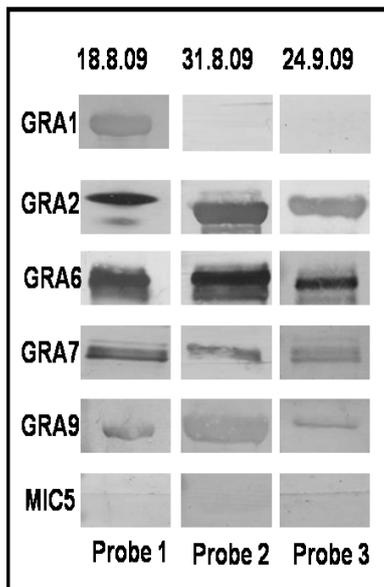


Abbildung 12: Detektion von IgG-Ak unter Nutzung der rekombinanten His₆-Fusionsproteine im Fall einer reaktivierten, chronischen Toxoplasmose. Aufgetragen wurden Serumproben eines Patienten im zeitlichen Verlauf einer Infektion. Die vom Patienten produzierten IgG-Ak gegen rGRA2, rGRA6, rGRA7 als auch rGRA9 sind im Verlauf durch spezifische Banden nachweisbar, welche allerdings in Ihrer Intensität im Falle von rGRA2 und rGRA7 abnehmen. Spezifische IgG-Ak gegen rMIC5 wurden vom Patienten nicht gebildet, gegen rGRA1 konnten spezifische AK nur in der ersten Serumprobe analysiert werden.

Im Falle der in Abbildung 12 im Immunoblot eingesetzten Seren handelte es sich um eine Reaktivierung einer chronischen Toxoplasmose bei einem hämatoonkologisch vorerkrankten Patienten, der zur Zeit der Probenentnahme 1 klinische Zeichen einer akuten Toxoplasmose präsentierte. Die Spezifität der IgG-Antikörper gegen rGRA2, rGRA6, rGRA7 und rGRA9 blieb im Verlauf über einen Monat hinaus weitgehend konstant, wohingegen der Nachweis spezifischer IgG-Ak gegen rMIC5 vollständig ausblieb und der Nachweis spezifischer IgG-AK gegen rGRA1 nur in der ersten Serumprobe des Probanden möglich war. Der Nachweis belegt, dass der Einsatz verschiedener Seren eines Patienten im Verlauf vergleichbare, spezifische Bandenmuster aufweist. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zeigen sich daher als reproduzierbar.

4.4 Western-Blot-Analysen zum Nachweis eines Leihiters

Eine pränatal erworbene Toxoplasmose kann für Neugeborene ein hohes gesundheitliches Risiko darstellen und schwerwiegende Folgen wie einen Abort oder eine Retinochorioiditis nach sich ziehen. Jedoch auch klinisch inapparente Verläufe sind zu beobachten. Daher ist es besonders bedeutend Neugeborene beim geringsten klinischen

Verdacht ausreichend detailliert bezüglich einer Infektion zu untersuchen. Um die Antikörper-Produktion von Mutter und Kind auf Toxoplasmenantigene zu analysieren, kann der Western-Blot aufgrund seiner hohen Spezifität als geeignetes Nachweisverfahren dienen. Als Schutz vor akuten Infektionen bietet der IgG-Leihtiter eine Art Nestschutz für Neugeborene. Das Neugeborene erhält hierbei diaplazentar IgG-Ak der Mutter, die es in den ersten Monaten post partum noch nicht eigenständig bilden kann und die innerhalb der ersten sechs bis neun Monate abgebaut werden. Um im Falle einer chronischen Toxoplasmose der Mutter den diaplazentaren Übergang des Leihiters auf das Neugeborene nachzuweisen, wurden die rekombinanten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen geblottet. Diese wurden separat mit dem Serum der chronisch an Toxoplasmose erkrankten Mutter und dem Serum ihres neugeborenen Kindes inkubiert und auf spezifische IgG-Antikörper hin untersucht:

Das mütterliche Serum zeigte in den serologischen Vorergebnissen einen IFT-Titer von 1:256, eine positive IgG-Liaison und einen ISAGA-Titer von <1:500. Als serologische Resultate des Neugeborenen wurden ein IFT-Titer von 1:128 und eine positive IgG-Liaison ermittelt. Toxoplasmen- spezifische IgM-Ak, die im Rahmen einer intrauterinen Infektion vom Ungeborenen selbst gebildet werden, wurden im Serum des Neugeborenen nicht gefunden.

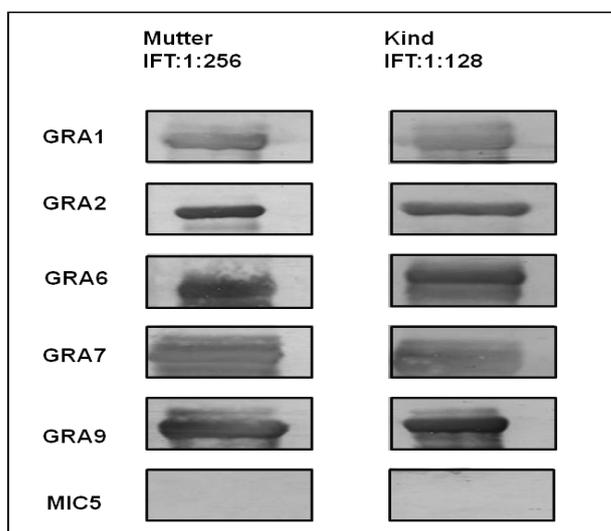


Abbildung 13: Detektion von IgG-Ak gegen die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 sowie rMIC5 in mütterlichem und kindlichem Serum

In Abbildung 13 ist die Detektion spezifischer IgG-Antikörper gegen die His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 mittels Immunoblot in Spur 1 nach Inkubation mit dem mütterlichen Serum und in Spur 2 nach Inkubation mit

dem Serum des Neugeborenen dargestellt. Im Falle von rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7 und rGRA9 konnten spezifische IgG-Ak in beiden Seren nachgewiesen werden. Im Falle von rMIC5 konnten hingegen spezifische IgG-Antikörper weder im Serum der Mutter noch in dem des Neugeborenen nachgewiesen werden. Die Detektion vergleichbarer Bandenmuster bei Mutter und Kind bestätigt, dass das Neugeborene über einen IgG-Leih­titer der Mutter verfügt.

4.5 Ergebnisse der IgG-Detektion von Seren mit verschiedene IFT-Titern

Um hinsichtlich der Detektion von Toxoplasmen-spezifischen Antikörpern der Klasse IgG eine repräsentative Aussage zu erzielen, wurden 48 Seren, die sich bezüglich ihres IFT-Titers unterschieden in Western-Blot-Analysen untersucht. Insgesamt wurden 13 *T. gondii*-negative Seren und 35 Seren von Patienten mit einer Toxoplasmose analysiert. Die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 sowie rMIC5 wurden hierfür im Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend mit dem zu analysierenden Serum inkubiert. Elf Seren mit einem IFT-Titer von 1:16 - ≤1:256, die eher einer chronischen Toxoplasmose entsprechen, wurden analysiert. Außerdem wurden zwölf Seren mit einem IFT-Titer zwischen >1:256 - ≤1:1024 untersucht. Die spezifische IgG-Detektion sollte auch im Rahmen einer akuten oder reaktivierten Toxoplasmose geprüft werden, wofür zwölf Seren mit einem IFT-Titer >1:1024 herangezogen wurden. Die standardisiert entwickelten Blots wurden durch drei Untersucher unabhängig voneinander ausgewertet und in einer Gesamtergebnistabelle festgehalten. Die nachfolgende Tabelle 5 zeigt die prozentuale Detektion der spezifischen IgG-Antikörper gegen die einzelnen rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine.

Protein						
IFT-Titer (Anzahl der untersuchten Serum)	GRA1	GRA2	GRA6	GRA7	GRA9	MIC5
IFT<1:16 (13)	8%	15%	23%	15%	8%	8%
IFT:1:16-≤1:256 (11)	64%	91%	91%	73%	73%	18%
IFT>1:256- ≤1:1024 (12)	67%	100%	92%	75%	75%	42%
IFT>1:1024 (12)	83%	92%	100%	100%	92%	67%

Tabelle 5: Detektion der IgG-Ak gegen die rekombinant hergestellten Fusionsproteine für verschiedene Serumgruppen unterteilt nach jeweiligem IFT-Titer des untersuchten Serums

Wie Tabelle 5 zeigt war es generell möglich in den IFT- positiven Seren spezifische IgG-Antikörper gegen die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine nachzuweisen. Die untersuchten Seren von chronisch mit *T. gondii* infizierten Probanden, die einen IFT-Titer von 1:16 - ≤1:256 aufwiesen, zeigten prozentual deutlich höhere Detektionsraten von Antikörpern gegen rGRA1, rGRA 2, rGRA6, rGRA7 sowie rGRA9 als die negativen Seren. GRA-spezifische Antikörper wurden zwar auch in einigen seronegativen Proben detektiert, so wurden beispielsweise in 15% bzw. 23% der seronegativen Seren IgG-Antikörper gegen rGRA2 und rGRA6 detektiert, jedoch war die Detektion von spezifischen IgG-Ak gegen rGRA2 und rGRA6 in 91% der Fälle in Seren mit einem IFT-Titer von 1:16 - ≤1:256 möglich.

Der Nachweis von spezifischen IgG-Ak gegen die rekombinant hergestellten Fusionsproteine in Seren mit einem IFT-Titer von >1:256 - ≤1:1024 zeigte sich beispielsweise im Falle von spezifischen IgG-Ak gegen rGRA2 in 100% der untersuchten Seren als möglich und auch in 75% der untersuchten Seren konnten spezifische IgG-Ak gegen rGRA6 und rGRA7 detektiert werden.

In den Seren von Patienten, die klinische Zeichen einer akuten Toxoplasmose zeigten sowie einen IFT-Titer von >1:1024 in serologischen Tests präsentierten, konnte auf Basis

der His₆-Fusionsproteine gezeigt werden, dass ein Nachweis von spezifischen IgG-Ak gegen rGRA6 und rGRA7 in 100% der Fälle erfolgte. Dagegen konnten gegen die His₆-Fusionsproteine rGRA2 sowie rGRA9 in den Western-Blot-Analysen spezifische IgG-Ak in 92% der Fälle detektiert werden.

Bis hierhin wurde ausschließlich die Detektion von spezifischen IgG-Ak gegen die rekombinant hergestellten, immunodominanten Antigene näher beleuchtet. Im akuten Verlauf der Infektion kommt darüber hinaus auch dem Nachweis der Immunglobuline M und A eine zentrale Bedeutung zu. Um das Vorhandensein spezifischer IgM- und IgA-Antikörper gegen die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine zu analysieren, wurde in weiteren Untersuchungen zusätzlich zur Detektion spezifischer IgG-Antikörper, die vorwiegend eine bereits länger bestehende Infektion mit *T. gondii* nachweisen, das Vorhandensein von Toxoplasmen-spezifischen Antikörpern der Klasse IgM und IgA im Serum von akut erkrankten Patienten untersucht.

4.6 Nachweis von Toxoplasmen-Antigen spezifischen IgM- und IgA-Antikörpern

Da gerade in frühen Stadien einer Infektion mit *T. gondii* die IgM- und IgA-Titer gegen die körperfremden Proteine des Parasiten ansteigen, sollte im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zum Nachweis spezifischer IgG untersucht werden, ob eine Detektion spezifischer Immunglobuline der Klasse M sowie A bei Einsatz der rekombinant hergestellten Antigene erzielt werden kann. Um die akute Phase der Infektion genauer zu analysieren, wurde ein entsprechendes *T. gondii*-positives Serum gewählt. In serologischen Voruntersuchungen wies das Serum einen IFT-Titer von 1:1024 auf und zeigte positive Ergebnisse in der IgM- und IgG-Liaison. Nach elektrophoretischer Auftrennung der rekombinanten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 und Blotting auf Nitrozellulosemembranen in dreifacher Ausführung wurden die Membranen mit dem Serum (IFT-Titer 1:1024) inkubiert und anschließend jeweils separat mit spezifischen, humanen IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern inkubiert und entwickelt.

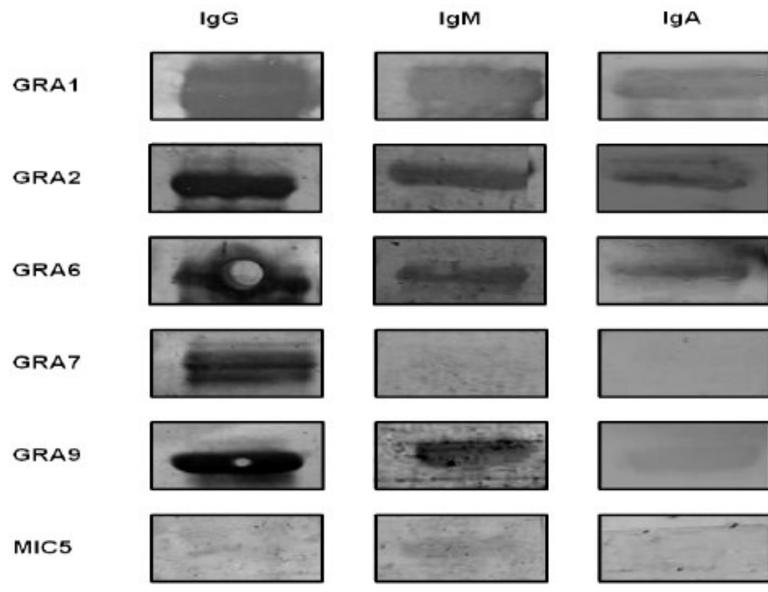


Abbildung 14: Detektion der spezifischen IgG-, IgM-, und IgA-Ak gegen die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 durch Einsatz eines *T. gondii*-positiven Serums. Das verwendete Serum zeigte in serologischen Tests einen IFT-Titer von 1:1024, positive IgM- und IgG-Liaison, sowie einen negativen ISAGA-Test.

In der Abbildung 14 ist gezeigt, dass neben der Detektion von IgG-Ak gegen die rekombinanten Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 ebenfalls eine Detektion von spezifischen IgM-Ak gegen die Proteine rGRA1, rGRA2, rGRA6 sowie rGRA9 erzielt werden konnte. Dagegen konnten wie in Abbildung 14 aufgeführt keine spezifischen Antikörper der Klasse IgM gegen das Fusionsprotein rGRA7 detektiert werden.

Zusätzlich zum Nachweis spezifischer IgM- Antikörper konnte auch das Vorhandensein spezifischer IgA-Ak gegen die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6 als auch rGRA9 gezeigt werden. Wie in der Abbildung 14 ersichtlich, erfolgte die Detektion von spezifischen IgA-Antikörpern gegenüber einer Detektion spezifischer IgM-Ak mit einem schwächeren Signal, was unter Umständen auf ein Detektionsproblem hinweist.

In dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die Detektion spezifischer IgM- und IgA-Antikörper gegen die rekombinanten, Toxoplasmen-spezifischen Antigene möglich ist. Um umfassendere Aussagen über die Detektion spezifischer IgM- und IgA-Antikörper zu erzielen, wurden 14 verschiedenen Seren, die einen ISAGA-Titer von $\geq 1:6400$ in serologischen Voruntersuchungen zeigten und somit als ISAGA-positiv gewertet wurden, analysiert. Die Antigene rGRA1, rGRA2, rGRA9 und rMIC5 wurde bei einer Konzentration von ca. 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit 2 μl eingesetzt. Die Fusionsproteine rGRA6 und rGRA7, die eine Konzentration von ca. 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufwiesen, wurden mit 12 μl eingesetzt und

elektrophoretisch aufgetrennt. Die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine wurden anschließend auf Nitrozellulosemembranen geblottet. Jede Membran wurde mit einem Serum mit positivem ISAGA-Titer, welches die akute Phase der Infektion präsentiert, inkubiert und anschließend nach mehreren Waschschritten mit humanen, spezifischen IgM- oder IgA-Sekundär-Antikörpern inkubiert. Es folgte die standardisierte Entwicklung. Anschließend wurden die Detektionen der Toxoplasmen-spezifischen IgM- (s.Tabelle 6) und IgA-Ak (s.Tabelle 7) gegen die verwendeten Antigene von drei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in einer Gesamtergebnistabelle festgehalten. Anschließend wurde die prozentuale Detektion der spezifischen Antikörper gegen das jeweilige Protein in negativen Seren und in den 14 ISAGA-positiven Seren ermittelt.

Protein	GRA1	GRA2	GRA6	GRA7	GRA9	MIC5
ISAGA-Titer (Anzahl der untersuchten Seren)						
negative Seren (13)	0%	15%	8%	0%	0%	0%
ISAGA-positive Seren\geq1:6400 (14)	0%	61%	92%	67%	42%	28%

Tabelle 6: Auswertung der Detektion der spezifischen IgM-Ak gegen die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9, rMIC5 für negative und ISAGA-positive Seren

Die Detektion spezifischer IgM-Antikörper gegen die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine war wie in Tabelle 6 dargestellt generell möglich. Die Seren von Patienten, die in den Vortests als negativ gewertet wurden, zeigten jedoch auch im Rahmen der Detektion der IgM- Antikörper gegen rGRA2 als auch rGRA6 zu einem geringen Prozentsatz spezifische Banden. Gegen rGRA1 konnten in den untersuchten Seren keine spezifischen IgM-AK analysiert werden. Jedoch gelang der Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen das His₆-Fusionsprotein rGRA2 in 61% der untersuchten Seren. Darüber hinaus konnten in 67% der untersuchten Seren spezifische IgM-AK gegen rGRA7 detektiert werden. Außerdem wurden in 92% der untersuchten Seren spezifische IgM-Antikörper gegen rGRA6 nachgewiesen.

Die Detektion spezifischer IgA-Antikörper gegen die Toxoplasmen-spezifischen Antigene ergab folgende Werte:

Protein:	GRA1	GRA2	GRA6	GRA7	GRA9	MIC5
ISAGA-Titer (Anzahl der untersuchten Seren):						
negative Seren (13)	8%	8%	8%	8%	15%	0%
ISAGA-positive Seren $\geq 1:6400$ (14)	0%	46%	44%	36%	8%	0%

Tabelle 7: Auswertung der Detektion der spezifischen IgA-Antikörper gegen die rekombinant hergestellten His₆-Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 sowie rMIC5. Es wurden 13 *T. gondii*-negative Seren und 14 Seren mit ISAGA $\geq 1:6400$ aufgeführt

Der Nachweis spezifischer IgA-Antikörper gegen die analysierten Toxoplasmen-Antigene wurde in Tabelle 7 zusammengefasst. Hierbei konnte die Detektion spezifischer IgA-Antikörper gegen die rekombinant hergestellten Proteine rGRA2 in 46%, gegen rGRA6 in 44% sowie gegen rGRA7 in 36% gezeigt werden. Spezifische IgA-Antikörper gegen rGRA1 und rMIC5 waren nicht nachweisbar. Wie bereits für die anderen Immunglobulinklassen beschrieben, konnten in einem relativ niedrigen Prozentsatz auch GRA-Protein-spezifische IgA-Antikörper in seronegativen Proben gefunden werden.

Diese Analysen stellen einen ersten Einblick der Verwendung der rekombinant hergestellten Toxoplasmen-spezifischen Antigenen rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und rMIC5 in Westernblotanalysen dar.

5. Diskussion

5.1. Serologische Verfahren zum Nachweis einer Toxoplasmose

Um eine Infektion mit *T. gondii* nachzuweisen gibt es viele unterschiedliche Methoden. So kann der Parasit aus Gewebeproben angezüchtet werden, jedoch ist der Direktnachweis der Erreger mittels PCR schneller und sensitiver. Immunhistologische Färbungen zum Direktnachweis des Parasiten werden nur noch im Rahmen von wissenschaftlichen Studien durchgeführt. Häufiger werden in Diagnostiklaboratorien serologische Untersuchungsverfahren eingesetzt um eine stattgefundene Infektion nachzuweisen. (Montoya *et al.*, 2002).

In der Routinediagnostik werden derzeit meistens serologische Untersuchungen zur Diagnose der Toxoplasmose herangezogen und die Produktion spezifischer Antikörper im Verlauf der Infektion analysiert. Eine besondere Bedeutung kommt der Bestimmung von Immunglobulin-Subklassen (IgG, M, A als auch E) bei der Stadiendiagnostik der Toxoplasmose zu. Dabei werden spezifische Antikörper der Subklassen M, A und E bei frischen Infektionen vermehrt nachgewiesen. Der alleinige Nachweis von *T. gondii*-spezifischen IgG wird eher als Hinweis auf eine länger zurückliegende Infektion gewertet.

Spezifische IgG-Antikörper werden meist mittels ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“), dem modifizierten direkten Agglutinationstest oder aber mittels IFT („immunofluorescence“-Test) nachgewiesen.

Spezifische IgG-Ak können ca. ein bis zwei Wochen nach Erstinfektion nachgewiesen werden, zeigen die höchste Konzentration nach ein bis zwei Monaten und persistieren gewöhnlich lebenslang (Montoya *et al.*, 2002). In aktuellen Arbeiten wird die Avidität der IgG-Ak analysiert. Die Avidität beschreibt die Stärke einer Mehrfachbindung zwischen Antikörper und Antigen. Sie ist in den ersten drei Monaten nach Infektion gering, danach findet man hoch avide IgG-Antikörper (Ali-Heydari *et al.*, 2013). Dies ist auf die Reifung der Ak-Antwort im Verlauf der Immunantwort zurückzuführen. Die Aviditätsbestimmung von IgG-Antikörpern kann daher genutzt werden, um zwischen einer kürzlich erworbenen und einer chronischen Toxoplasmose zu differenzieren.

Spezifische IgM-Ak gegen *T. gondii* können bei einer Primärinfektion etwas früher als spezifische IgG-Ak nachgewiesen werden und die Titer werden in den meisten Fällen einige Monate nach Primärinfektion wieder negativ. Trotzdem gibt es Individuen, bei denen eine Persistenz spezifischer IgM-Ak auch nach der akuten Phase der Infektion mit *T. gondii* beobachtet werden konnte. (Liesenfeld *et al.*, 1997).

IgA-Ak können ähnlich wie IgM-Ak früh im Rahmen einer *T. gondii* Primärinfektion nachgewiesen werden. Die Detektion spezifischer IgA-Antikörper kann ebenfalls mittels ELISA oder ISAGA erfolgen, wobei jedoch IgA-Ak genau wie IgM-Ak persistieren können (Stepik-Biek et al., 1990). Dennoch ist die Sensitivität der Tests zur Analyse spezifischer IgA-Ak zum Nachweis einer akuten Infektion etwas besser als die zur Detektion spezifischer IgM-Ak, weshalb die Detektion spezifischer IgA-Ak im Rahmen der Diagnose einer kongenitalen Toxoplasmose eine wichtige Rolle spielen kann (Stepik-Biek et al., 1990).

Die Detektion spezifischer IgE-Antikörper kann ebenfalls mittels ELISA analysiert werden (Montoya et al., 2002), jedoch ist die Dauer der IgE-Seropositivität gegen *T. gondii* kürzer als die der IgM- und IgA-Ak (Wong et al., 1993).

In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion von IgG-, IgM-, IgA- und IgE-Antikörpern gegen *T. gondii*-spezifische Proteine mittels Western Blot. Das Western Blot Verfahren haben wir ausgewählt, da diese Methode eine höhere Spezifität als die gewöhnlichen ELISA-Untersuchungen besitzt. Es konnten spezifische IgG-, IgM- sowie IgA-AK gegen die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine nachgewiesen werden. Die Detektion Parasiten-spezifischer IgE- Ak gelang jedoch in keiner der analysierten Proben. Ein Grund hierfür könnte die kurze Zeitspanne sein, in der IgE- Antikörper nach frischer Infektion im Serum vorhanden sind (Foudrinier et al., 2002).

5.2 Rekombinante Proteine in serologischen Analysen

In der labormedizinischen Diagnostik wird die Toxoplasmose, wie bereits erwähnt, gewöhnlich anhand des Vorkommens spezifischer Antikörper im Serum des Patienten nachgewiesen. Hierfür werden in kommerziell erhältlichen Tests oft lysierte Toxoplasmen als Antigen eingesetzt. Diese Lysate werden aus Tachyzoiten, die in Mäusen oder auf einer Gewebekultur gezüchtet werden, hergestellt. Die Qualität des *Toxoplasma gondii*-Lysat (TLA) kann von Labor zu Labor stark variieren. So kann das *T. gondii*-Lysat variable Mengen nicht-parasitärer Proteine, beispielsweise der eukaryoten Wirtszellen oder des Kulturmediums, enthalten (Wu et al., 2009). Daher sind serologische Analysen, welche auf nativen Toxoplasmen-Antigenen basieren, schwierig zu standardisieren und zeigen eine Variabilität in der Testgenauigkeit. (Kotresha et al., 2010; Holec-Gasior et al., 2013).

Rekombinante Proteine erlauben eine bessere Standardisierung von Tests und können in größeren Mengen ohne größere Verunreinigung produziert werden (Pietkiewicz et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir daher rekombinant hergestellte Antigene von *T.*

gondii und legten unseren Fokus auf die Analyse der immundominanten GRA-Proteine sowie des MIC 5-Proteins. Um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen wurden Antikörper gegen die rekombinant hergestellten Proteine GRA1, GRA2, GRA6, GRA7, GRA9 sowie MIC5 (im Folgenden als rGRA1, rGRA2 usw. bezeichnet) im Immunoblot-Verfahren nachgewiesen.

5.2.1 Detektion spezifischer IgG-Antikörper gegen rekombinante *T. gondii*- Proteine

In der vorliegenden Arbeit wurden 48 Seren von Patienten, bei denen sich klinisch der Verdacht auf eine Toxoplasmose-Infektion ergab, untersucht. Die humanen Seren waren vorab durch die serologische Abteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf analysiert worden, wobei das Testergebnis dem Untersucher vorab nicht bekannt war. Nach Auswertung des Vorhandenseins von *T. gondii*-spezifischen IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern gegen die rekombinanten *T. gondii*-Proteine, wurden die humanen Seren nach dem IFT-Titer in vier Gruppen eingeteilt:

1. Gruppe IFT-Titer: <1:16 (13 Seren)
2. Gruppe IFT-Titer: 1:16- ≤1:256 (11 Seren)
3. Gruppe IFT-Titer: 1:256- ≤1:1024 (12 Seren)
4. Gruppe IFT-Titer: >1:1024 (12 Seren)

Die 1. Gruppe enthält Seren, die in mikrobiologischen Screening- Analysen als negativ für das Vorliegen einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* gewertet werden. Die 2. Gruppe repräsentiert Seren von Patienten, die eine chronische Infektion mit *T. gondii* zeigen. Gruppe 3 und 4 enthält Seren von Patienten mit akuter oder reaktiver Toxoplasmose.

Die Reaktivität dieser Seren mit den bereits beschriebenen sechs rekombinanten Antigenen wurde im Immunoblot Verfahren untersucht (s. Kapitel 4.2.1).

In der vorliegenden Arbeit konnten spezifische IgG-Antikörper gegen rGRA1 in rund 71% der untersuchten Seren von Patienten, die an einer Toxoplasmose erkrankt waren, nachgewiesen werden. In 64% der Seren von Patienten mit chronischer Toxoplasmose und in 75% der Seren von Patienten mit akuter oder reaktiver Toxoplasmose konnten spezifische IgG detektiert werden.

Zu einigen der von mir untersuchten GRA- Antigene sind bereits Serologie-Ergebnisse publiziert. So überprüfte z.B. Ferrandiz *et al.*, 2004 in Seren von schwangeren Patientinnen die Nachweisbarkeit von spezifischen Antikörpern gegen rGRA1 sowie rGRA6. In Ferrandiz' Arbeit wurden GRA1 und GRA6-Nt in *E. coli JM 109* als Glutathion-S-Transferase-Proteine

synthetisiert (Ferrandiz *et al.*, 2004). Die Antigene GRA1 (648bpNaeI-PVUII) und GRA6-Nt (330bp) wurden in ELISA System eingesetzt. Die Gruppe um Ferrandiz analysierte 32 Seren von Patienten mit einer akuten Toxoplasmose, 46 Seren von chronisch Infizierten als auch 100 seronegative Proben.

Wie in Tabelle 8 dargestellt zeigte Ferrandiz für die Detektion spezifischer IgG gegen rGRA1 eine Nachweishäufigkeit von 34% in Seren von akut Infizierten und von 78% in Seren chronisch infizierter Patienten. Die höhere Nachweisfrequenz für GRA1-spezifische IgG-Antikörper in Seren akut mit *T. gondii* infizierter Probanden in der vorliegenden Arbeit (75%), könnte durch eine höhere Sensitivität der hier verwendeten Western Blot-Methode begründet sein.

In Ferrandiz' Arbeit wurden auch spezifische IgG-Antikörper gegen rGRA6-Nt mit 84% Sensitivität in Seren von Patienten mit akuter oder reaktiver Toxoplasmose detektiert. In Seren von Patienten mit chronischer Toxoplasmose konnte in 83% eine IgG-Reaktivität nachgewiesen werden. Dies korreliert mit den Befunden der vorliegenden Arbeit, die zeigt, dass in 96% aller akuten Toxoplasma-Infektionen und in 91% aller chronischen Toxoplasma-Infektionen IgG-Antikörper gegen rGRA6 in den Seren nachweisbar sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Daten zu GRA6-spezifischen Antikörpern in der vorliegenden Arbeit und in der Publikation von Ferrandiz prinzipiell ähnlich sind, es gibt jedoch einige nennenswerte Unterschiede beim Nachweis weiterer GRA-spezifischer Antikörper: So konnte Ferrandiz in der Gruppe der akut infizierten Probanden deutlich weniger häufig GRA1 spezifische Antikörper (34%) detektieren als mittels WB in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden (75%). Eine Ursache hierfür könnte die Auswahl des Patientenkollektivs darstellen. In Ferrandiz' Arbeit bestand dies vorwiegend aus französischen Patientinnen, die im Rahmen der Schwangerschaft ein Toxoplasmose-Screening vornehmen ließen. In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von Patienten aus einem multidisziplinären Universitätsklinikum verwendet. Dies sind Menschen unterschiedlichen Alters, welche beispielsweise als internistische Patienten im Rahmen einer Leukämie oder HIV-Infektion oder als chirurgische Patienten nach einer Herztransplantation immunsupprimiert waren und eine reaktivierte Toxoplasmose zeigten. Ebenfalls sind pädiatrische Patienten, die im Rahmen des Verdachts einer kongenitalen Toxoplasmose serologisch getestet wurden, repräsentiert.

Die Analyse der seronegativen Proben ergab sowohl im ELISA (Ferrandiz), als auch im Western Blot-Verfahren, in 2% (ELISA) bzw. 8 % (Western Blot-GRA1) und 23% (Western Blot-GRA6) positive Ergebnisse. Eine Erklärung für die Detektion spezifischer IgG gegen

rekombinante Proteine in ELISA oder Western Blot- Analysen mit Proben seronegativer Spender könnte das Vorliegen einer Kreuzreaktivität sein. Diese Kreuzreaktivität könnte durch eine vorherige Infektion mit einem Vertreter der Untergattung *Eimeriina* bedingt sein. Diese Erreger sind ebenfalls humanpathogen (z.B. *Cryptosporidium*, *Isospora*) genetisch eng mit *T. gondii* verwandt (Schulzig *et al.*, 2004) und weisen homologe Proteine auf.

Bei der Nachweishäufigkeit von rGRA6-spezifischen Antikörpern ergaben sich nur geringe Unterschiede zwischen der vorliegenden Arbeit und den publizierten Daten von Ferrandiz. Hier war die Nachweisfrequenz in den WB Analysen (96%) etwas höher als in den ELISA Untersuchungen von Ferrandiz (84%). Der Unterschied könnte durch eine höhere Sensitivität der Western Blot-Analysen für rGRA6-spezifische Ak erklärt werden. Dies würde auch die erhöhte Nachweisrate von rGRA6 spezifischen Ak in der mittels WB analysierten seronegativen Gruppe erklären.

Arbeit	rGra1	rGra2	rGra6	rGra7	rGra9	rMic5	Toxoplasmose (Anzahl untersuchter Seren)
Vorliegende Arbeit (Western Blot, His ₆ -Fusionsproteine)	75%	96%	96%	88%	84%	55%	Gruppe 3+4(24)
	64%	91%	91%	73%	73%	18%	Gruppe 2(11)
	8%	15%	23%	15%	8%	8%	Gruppe 1(13)
Ferrandiz 2004 (ELISA, GST-Fusionsproteine)	34%		84%				Akut(32)
	78%		83%				Chronisch(46)
	2%		2%				Negativ(100)
Lecordier 2000 (ELISA, GST-Fusionsproteine)	86%		95%				Akut (45)
	54%		96%				Chronisch (55)
	5%		3%				Negativ (100)
Pietkiewicz 2004 (ELISA, His ₆ –Fusionsproteine)	77%			76%			Akut (62)
	90%			80%			Chronisch(20)
	0%			0%			Negativ(20)
Kotresha 2012 (Western Blot His ₆ –Fusionsprotein)				100%			Akut (20)
				40%			Chronisch(20)
				0%			Negativ(20)
Golkar 2007 (ELISA, His ₆ –Fusionsprotein)		98%					Akut (42)
		68%					Chronisch (63)
		4%					Negativ(28)
Ching 2012 (Western Blot, Polyhistidin-Tag- Fusionsproteine)		100%					Akut(32)
		61,5%					Chronisch(26)
		10%					Negativ(30)
Tenter 1991 (ELISA, H4+H11- GST-Polypeptide)						68%	Akut (59)
						14%	Chronisch(194)
						0%	Negativ(151)

Tabelle 8: spezifische IgG-Detektion gegen die in dieser Arbeit untersuchten Antigene im Vergleich mit publizierten Arbeiten

Lecordier *et al.*, 2000 untersuchte ebenfalls die Bedeutung von GRA1- und GRA6-spezifischen Antikörpern für die serologische Diagnose einer Toxoplasmose. Diese Arbeitsgruppe verwendete Glutathion-S-Transferase-Fusionsantigene von GRA1 und GRA6-Nt in ELISA Studien. 100 Seren von *T. gondii*-positiven und 98 Seren von seronegativen Probanden wurden für diese Studie von Sanofi Diagnostics Pasteur (Marnes la Coquette, Frankreich) bereitgestellt. In der Tabelle 8 sind die Ergebnisse zur Nachweisfrequenz von IgG-Antikörpern gegen rekombinante GRA1 und GRA6 Antigene dargestellt.

Die von Lecordier ermittelte Prävalenz von GRA1 spezifischen Antikörpern in Seren akut infizierter Probanden betrug 86% und liegt damit etwas höher als die Prävalenz von 75% in der hier vorliegenden Arbeit. Unter Verwendung der *T. gondii*-positiven Seren von chronisch Infizierten konnte Lecordier in 54% der Seren spezifische IgG-Antikörper detektieren, wobei mittels Western Blot-Analysen in der hier vorliegenden Arbeit in 64% spezifische IgG gegen rGRA1 nachgewiesen werden konnten.

Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit verwendete Lecordier sowohl ein rekombinantes C-terminales-GRA6-Fusionsprotein, als auch ein rekombinantes N-terminales GRA6-Fusionsprotein. Das C-terminale rGRA6-Fragment zeigte keine spezifische IgG-Reaktivität im Western Blot. Der Einsatz des N-terminalen rGRA6 im Western Blot zeigte allerdings eine sehr gute Reaktivität, wobei die Analyse der 100 *T. gondii*-positiven Seren unter Verwendung des N-terminalen rGRA6 im ELISA in 96% eine Detektion spezifischer IgG's zeigte. Eine Begründung hierfür könnte das Vorliegen eines immundominanten B-Zell-Epitops im N-terminalen Teil des GRA6-Fusionsproteins sein. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das komplette GRA6 als GRA6-His₆-Fusionsprotein hergestellt, welches natürlich auch das erwähnte immundominante B-Zell Epitop enthält.

Die Nachweisfrequenz rGRA6-spezifischer Antikörper in Seren von Patienten mit akuter und chronischer Toxoplasmose sind in beiden Arbeiten sehr ähnlich. In Seren akut infizierter Probanden konnte Lecordier mittels ELISA in 95% spezifische IgG gegen GRA6 detektieren. In der vorliegenden Arbeit konnten mittels Western Blot-Analysen in 96% der Proben spezifische IgG nachgewiesen werden. In Seren chronisch infizierter Patienten konnte Lecordier in 96% spezifische IgG nachweisen, die vorliegende Arbeit zeigte eine Nachweisfrequenz von 91%.

In der Arbeit von Pietkiewicz *et al.*, 2004 wurden spezifische Antikörper gegen rGRA1 und rGRA7 untersucht. Als Antigene wurden His₆-Fusionsproteine von GRA1 sowie GRA7 im ELISA eingesetzt. Für die Analysen wurden 102 Seren von polnischen und dänischen Personen mittels ELISA verwendet.

Die prozentuale Detektion spezifischer IgG- Antikörper gegen die Antigene rGRA1 bzw. rGRA7 bezogen auf die Anzahl der untersuchten humanen Seren mit einer chronischen bzw. akuten Toxoplasmose, die von Pietkiewicz ermittelt wurde, ist ebenfalls in Tabelle 8 aufgeführt. Die IgG-Detektion gegen rGRA1 in Seren akuter Toxoplasmose-Infektionen gelang in seiner und in der vorliegenden Arbeit vergleichbar gut: 75% in der vorliegende Arbeit und 77% in der Arbeit von Pietkiewicz. Im Unterschied zur hier vorliegenden Arbeit (64%) konnte Pietkiewicz jedoch eine höhere spezifische IgG-Detektion (90%) gegen rGRA1 in den humanen Seren mit chronischer Toxoplasmose demonstrieren.

Die IgG-Nachweisrate für rGRA7-spezifische Antikörper war in Seren von akut infizierten Personen in der hier vorliegenden Arbeit mit 88% etwas höher als bei Pietkiewicz mit 76%. Unter Verwendung der Seren von Patienten mit chronischer Toxoplasmose konnten in der hier vorliegenden Arbeit in 73% und in der Arbeit von Pietkiewicz in 80% der Proben rGRA7-spezifische Antikörper gefunden werden.

Auch Kotresha *et al.*, 2012 untersuchte die Reaktivität von Patientenseren mit dem GRA7 Antigen. In dieser Studie wurden 60 Seren von Patienten mit akuter oder chronischer Toxoplasmose sowie Proben von seronegativen Patienten untersucht. Die Arbeitsgruppe fand GRA7-spezifische Antikörper in allen untersuchten Seren von Patienten mit einer akuten Toxoplasmose. Bei Patienten mit einer chronischen Toxoplasmose lag die Nachweisrate der GRA7-spezifischen Antikörper bei 40 %. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in den Seren von Patienten mit einer akuten Toxoplasmose eine höhere Nachweisrate detektiert als in den Seren der chronisch Infizierten. Jedoch war der Unterschied zwischen beiden Gruppen gering (88 vs. 73 %). Zusammenfassend konnten die Daten der vorliegenden Studie und die publizierten Daten von Pietkiewicz den Befund von Kotresha, dass anti-GRA7 Antikörper besonders in der akuten Phase der Toxoplasmose nachweisbar sind, nicht untermauern. Dies steht im Gegensatz zu Arbeiten von Pfrepper *et al.*, 2005 und Nigro *et al.*, 2003 die beide eine stärkere anti-GRA7 Detektion in Seren von Patienten mit einer akuten Toxoplasmose fanden.

Neben GRA7 wird auch GRA2 als ein Antigen angesehen, dass in der Frühphase der Toxoplasmose besonders gut von spezifischen Antikörpern erkannt wird. Golkar *et al.*, 2007 zeigte mittels ELISA eine hohe Detektionsrate spezifischer IgG-Ak gegen rGRA2 im Rahmen einer akuten Toxoplasmose bei schwangeren Frauen in Iran (100%) und Frankreich (95,8%). Im Rahmen einer chronischen Infektion konnten mittels ELISA spezifische IgG-Ak gegen rGRA2 nur in 65,7% (Frankreich) und in 71,4% (Iran) detektiert werden.

Holec-Gasior *et al.*, 2009 zeigte eine spezifische Detektion von IgG-Ak gegen rGRA2 in allen Serumproben von Patienten mit einer akuten Toxoplasmose während nur 22% der Patienten mit einer chronischen Toxoplasmose Antikörper gegen rGRA2 besaßen. In der vorliegenden Arbeit wurde in Seren von Patienten mit einer akuten Toxoplasmose (n=24) in 96% spezifische IgG-Ak gegen rGRA2 gefunden. In Seren von Patienten mit chronischer Toxoplasmose (n=11) konnten ebenfalls häufig (91%) spezifische IgG-Ak gegen rGRA2 detektiert werden. Zusammenfassend scheint rGRA2 gerade bei der Diagnostik einer akuten Toxoplasmose ein wichtiges diagnostisches Antigen zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch auch in Seren chronisch infizierter Patienten mit einer hohen Frequenz GRA2-spezifische Antikörper gefunden. Ein Grund hierfür könnte die höhere Sensitivität des verwendeten Western Blot Verfahrens gegenüber des von anderen Arbeitsgruppen verwendeten ELISA's sein.

Die Arbeitsgruppe um Ching 2013 benutzte ein Western Blot Verfahren zum Nachweis GRA2-spezifischer Antikörper und fand eine Nachweisfrequenz von 100 % bei Patienten mit akuter bzw. 61% bei Patienten mit chronischer Toxoplasmose. Jedoch ist die positive Nachweisquote von GRA2 in Seren chronisch infizierter Personen mit ca. 60-70% (Ching *et al.*, 2013 und Golkar *et al.*, 2007) nicht so niedrig, dass eine Vorhersage des Infektionszeitpunktes durch Analyse der anti-GRA2 Antikörper möglich ist.

Die Toxoplasmen-Antigene GRA1-7 sind schon recht lange bekannt, und wie erwähnt schon von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichem Umfang in serologischen Assays eingesetzt worden. Für das Antigen GRA9 liegen bisher noch wenige Publikationen anderer Gruppen vor. GRA9 wurde von Adjogble *et al.*, 2004 erstmals charakterisiert und dessen Interaktions- und Sekretionsverhalten von Spekker, 2008 analysiert.

Die Seren von akut infizierten Probanden zeigten in der hier vorliegenden Arbeit in 84% Parasiten-spezifische IgG-Ak gegen rGRA9. Unter Verwendung Seren chronisch infizierter Patienten konnte eine Detektion von 73% gezeigt werden. Hotop, 2011 zeigte mittels Lineblot eine geringere Nachweisfrequenz spezifischer anti-GRA9-IgG-Antikörper: 42% in Seren akut infizierter Patienten (n=23) und 43% in Seren chronisch Infizierter (n=28).

Eine Begründung hierfür könnte sein, dass sie im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit einen Lineblot verwendete, unter dessen Anwendung man mehrere Proteine auf eine PVDF-Membran auftragen kann. Der Vorteil besteht darin, dass man das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen viele Antigene in einem Arbeitsschritt unter Einsparung von Serum untersuchen kann. Ein Schwachpunkt des Lineblots ist, dass seine Spezifität direkt

mit der Reinheit des Antigens korreliert, da die Größenseparation durch elektrischen Transfer entfällt. Somit ist die Spezifität des Lineblots geringer als die des Western Blots. Nockemann *et al.*, 1998 zeigte im Gegensatz dazu, dass vor allem akut- infizierte Patienten IgG-Antikörper gegen das native GRA9(B10) bildeten.

Western Blot- und ELISA-Verfahren können gleichermaßen zur Analyse Antigen-spezifischer Immunantworten verwendet werden. Die beiden Methoden sind allerdings grundsätzlich unterschiedlich. Die verwendeten Oberflächen (z. B. Polyvinylidenfluorid versus Polystyrol) weisen eine unterschiedliche Bindung von Proteinen auf. Außerdem weisen native Antigene oftmals eine abweichende Proteinfaltung zu rekombinant hergestellten Antigenen auf, welches ebenfalls zu einer unterschiedlichen Reaktivität führen kann (Hotop, 2011). Ferner sind rekombinante Antigene beispielsweise in der Regel nicht glykosyliert. Desweiteren können in ELISA und Western Blot native oder denaturierte Proteine eingesetzt werden. Im Rahmen der Denaturierung bleibt die Primärstruktur eines Proteins, seine AS-Sequenz, erhalten, aber Sekundär- und Tertiärstruktur, die seine native Faltungsform ausmachen, gehen verloren. Somit kann es im Rahmen der Denaturierung ebenfalls zur Veränderung der Reaktivität eines Antigens kommen.

Hotop *et al.*, 2014 untersuchte Hühner- und Truthahnsereen auf spezifische IgY-Antikörper gegen rekombinant hergestelltes GRA1, rGRA6 und rGRA9. Die Tiere wurden hierfür experimentell mit Oozysten oder Tachyzoiten infiziert und die Seren wurden mittels Lineblot untersucht.

IgY ist eng verwandt mit dem IgG der Säugetiere (Magor *et al.*, 2011). Strukturell besteht IgY ebenfalls aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, was dem Aufbau des IgG gleicht. Anders als IgG bindet IgY nicht an zelluläre Fc-Rezeptoren.

In Hotops Arbeit zeigten die Seren der Truthähne nach einer Infektion mit Oozysten eine stärkere IgY-Antwort gegen rGRA6 und rGRA9 bis 63 Tage post infectionem als bei einer Infektion mit Tachyzoiten. rGRA1-spezifische IgY konnten weder in mit Tachyzoiten noch mit Oozysten infizierten Truthähnen nachgewiesen werden.

Im Falle der Hühnerseren zeigte sich ein starker Anstieg rGRA9- sowie rGRA1-spezifischer IgY-Antikörper sieben bis 14 Tage post infectionem, danach fiel der Antikörperlevel ab, um am Tag 42-63 wieder deutlich anzusteigen. Pürzel *et al.*, 2009 zeigte, dass Hühner-IgY ähnlich dem humanen IgA an seinen Rezeptor bindet. So wurde in Hotops Arbeit diskutiert, ob das Hühner-IgY eventuell eine ähnliche Kinetik wie das humane IgA und IgE zeigt, womit sich auch die Kinetik der IgY-Antikörper im Falle von rGRA1 und rGRA9 in den Hühnerseren

erklären ließe. Die stärkste IgY-Immunantwort in den Hühnerseren konnte gegen rGRA6 detektiert werden. Die Arbeit von Hotop zeigt, dass sowohl in akut mit *T. gondii* infizierten Hühnern als auch Truthähnen eine spezifische IgY-Immunglobulinsynthese gegen rGRA6 und rGRA9 erfolgt. Jedoch schien der Nachweis spezifischer IgY mittels Lineblot in Hühnerseren bei der Erfassung der Durchseuchung keinen Vorteil zu erbringen, weil die Abwesenheit spezifischer IgY 21-42 Tage post infectionem zu falsch negativen Ergebnissen führen könnte.

Das MIC5-Protein gehört zur Familie der Mikronemen-Proteine, die für die Motilität des Parasiten *T. gondii* als auch für die Invasion der Wirtszelle unverzichtbar sind. In DNA-Analysen zu MIC5 konnte gezeigt werden, dass das Protein ein immundominantes Antigen, das sog. H4 Segment, enthält (Brydges *et al.*, 2000). In Arbeiten mit experimentell infizierten Schweinen zeigte das rekombinant hergestellte H4-Antigen eine starke Immunantwort, die zwischen vier Wochen bis vier Monaten nach Infektion anhielt (Andrews *et al.*, 1996). Außerdem reagierte das rekombinant hergestellte H4-Antigen im ELISA in frühen Phasen post infectionem stärker als das native H4-Antigen. Somit schien es interessant die Eignung des H4-Antigens für die Diagnose einer akuten Infektion beim Menschen mittels des rekombinant hergestellten MIC5 zu analysieren. Um die Eignung des rMIC5- Proteins als Antigen in serologischen Untersuchungen zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit MIC5 in Volllänge rekombinant hergestellt und in Western Blot Analysen eingesetzt.

In Seren von Patienten mit akuter oder reaktiver Toxoplasmose konnten spezifische IgG in 55% und in chronischen Seren zu 18 % detektiert werden. Tenter *et al.*, 1991 untersuchte mittels ELISA humane, *T. gondii*-positive Seren auf das Vorliegen von spezifischen Antikörpern gegen H4/GST oder H11/GST. Hierbei konnten in 68% der akut mit *T. gondii* infizierten Seren Antikörper gegen H4 und/oder H11(GRA4) nachgewiesen werden. Die Seren der Personen mit chronischer Toxoplasmose zeigten nur in 14% spezifische Antikörper, was den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit ähnelt.

Hotop, 2011 zeigte in Ihrer Dissertation bei der Detektion humaner IgG-AK in Seren von akut und chronisch Infizierten bereits eine geringe Nachweisfrequenz von rMIC5 (<10%).

5.2.2 Verwendung von Antigenkombinationen zur Steigerung der Sensitivität der Detektion

Um im Falle von *T. gondii*- positiven Seren eine hohe Detektion spezifischer Antikörper gegen die rekombinant hergestellten Proteine zu erzielen und dadurch die relative

Sensitivität zu verbessern, ist es ein probates Mittel mehrere immundominante Antigene zu mischen. Diese Strategie verfolgte z. B. Jacobs *et al.*, 1999, welche GRA7 und das C-terminale Fragment des ROP2-Proteins rekombinant hergestellt haben und als Antigenmischung im ELISA einsetzten. Damit konnte die Sensitivität der IgG-Detektion von 81% (für rGRA7) und 88% (für rROP2) auf eine Gesamtsensitivität von 96% gesteigert werde.

Pietkiewicz *et al.*, 2004 verwendete eine Kombination der drei rekombinanten Antigene rGRA1(80,5%), rGRA7(78%), rSAG1(90,2%) in einem ELISA und konnte so eine 97,5%-ige Testsensitivität erzielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde pro Western Blot jeweils nur ein rekombinantes Protein verwendet, um generell die Detektion spezifischer Antikörper für jedes einzelne der untersuchten Antigene zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit könnte die Testsensitivität durch eine Kombination aus rGRA2, rGRA6 und rGRA7 auf 100% gesteigert werden, um zwischen positivem oder negativem Befund zu diskriminieren. Weitere Arbeiten mit höherer Fallzahl könnten klären, ob eine Zweifachkombination verschiedener in dieser Arbeit hergestellter rekombinanter Antigene auch eine 100-ige Gesamtsensitivität der Detektion spezifischer IgG erreichen könnte.

5.2.3 Detektion spezifischer IgM- Antikörper gegen rekombinante *T. gondii*- Proteine zur Erkennung einer akuten Toxoplasmose

Der Nachweis von *T. gondii* spezifischen IgM- Antikörpern wird als Hinweis auf eine Primärinfektion gewertet. Spezifische IgM-Antikörper werden mittels „double-sandwich-ELISA“ oder „capture“ IgM-ELISA (s. Kapitel 3.3.2), -IFT (s. Kapitel 3.3.1) oder IgM-ISAGA (s. Kapitel 3.3.3) nachgewiesen.

Dementsprechend schien es interessant, gegen welche der in dieser Arbeit synthetisierten rekombinanten Antigene mittels Immunoblot spezifische IgM- und IgA-Antikörper nachweisbar sind.

Die höchste Nachweisfrequenz zeigte in der hier vorliegenden Arbeit die Detektion spezifischer IgM-Ak gegen rGRA6 mit 92%. Auch Golkar *et al.*, 2008 zeigte eine Sensitivität von 91,5% unter Verwendung von Fusionsproteinen in ELISA bezüglich der IgM-Ak-Detektion gegen rGRA6 in Seren akut Infizierter. Die Arbeit von Golkar *et al.*, 2008 deutete GRA6 als mögliches Antigen zur Diskriminierung zwischen akuter und chronischer Toxoplasmose. Betrachtet man die Detektion spezifischer IgM-Ak in Seren chronisch Infizierter Probanden zeigen sich Unterschiede zwischen Golkar's Arbeit (2,9%

Nachweisfrequenz) und der hier vorliegenden Arbeit (45% Nachweisfrequenz). Somit konnten wir die These, dass sich rGRA6 als Antigen zur Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Toxoplasmose eignet, mit unseren Daten nicht bestätigen.

Saadatnia *et al.*, 2012 zeigte in 72% der Seren mit akuter Toxoplasmose spezifische IgM-Ak gegen GRA7. Sie nutzte *T. gondii*- Lysat in Western Blot-Analysen. In der hier vorliegenden Arbeit konnten in 67% der Seren mit akuter Toxoplasmose rGRA7- spezifische IgM-Antikörper detektiert werden. Saadatnia zeigte allerdings auch in 16% der in Voruntersuchungen als *T. gondii*-negativ gewerteten Seren einen positiven GRA7-spezifischen IgM-Nachweis. Er schloss in die Gruppe der Toxoplasmose-negativen Patienten neben vollkommen Gesunden auch Patienten mit anderen Infektionen (Malaria, Leptospirose, Dengue-Fieber) ein, was eventuell die falsch-positiven Ergebnisse im Sinne einer Kreuzreaktion verursacht haben könnte.

Aubert *et al.*, 2000 konnte mittels IgM-rec-ELISA in 72% rGRA7-spezifische IgM nachweisen. Er untersuchte 142 humane Seren, die in Voruntersuchungen das Profil einer akuten oder kürzlich serokonvertierten Toxoplasmose präsentierten. Hierbei wurden Mikrotiterplatten mit rGRA7 beschichtet und spezifisches IgM mittels ELISA nachgewiesen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten rGRA7-spezifische IgM-Antikörper in 67% aller untersuchten Seren, die von akut Infizierten stammten, nachgewiesen werden.

Somit decken sich die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen der Arbeit von Aubert *et al.*, 2000.

Bereits Hotop beschrieb 2012, dass die Detektion spezifischer IgG-Antikörper gegen die rekombinant hergestellten Proteine rGRA2, rGRA6 und rGRA7 eher als Marker für den Nachweis einer akuten Toxoplasmose angesehen werden kann (Golkar *et al.*, 2007; Holec-Gasior *et al.*, 2009, Redlich und Muller, 1998; Hiszczyńska-Sawicka *et al.*, 2005; Golkar *et al.*, 2008; Jacobs *et al.*, 1998; Pietkiewicz *et al.*, 2004; Sadeghiani *et al.*, 2009). Daher schien in der hier vorliegenden Arbeit auch die Nachweisfrequenz spezifischer IgM-Antikörper gegen diese Proteine von Interesse.

Arbeit	rGra1	rGra2	rGra6	rGra7	rGra9	rMic5	Toxoplasmose(Anzahl untersuchter Seren)
Vorliegende Arbeit (Western Blot, His ₆ -Fusionsproteine)	0%	61%	92%	67%	42%	28%	ISAGA>1:6400(14)
	0%	36%	45%	36%	18%	9%	Chronisch (11)
	0%	15%	8%	0%	0%	0%	Gruppe 1(13)
Saadatnia 2012 (Western Blot, T.g.-Lysat)				72%			Akut(75)
				5%			Chronisch(10)
				16%			Negativ(20)
Aubert 2000 (rec-ELISA, CKS-Fusionsproteine)				72%			Akut (142)
Golkar 2008 (ELISA, Fusionsproteine)			91,7%				Akut (24)
			2,9%				Chronisch(34)

Tabelle 9: spezifische IgM-Detektion gegen die in dieser Arbeit untersuchten Antigene im Vergleich mit anderen Arbeiten

Zusammenfassend konnte in meiner Arbeit im Falle einer akuten Toxoplasmose die Detektion spezifischer IgM-Antikörper gegen die Proteine rGRA2, rGRA6 sowie rGRA7 mit Sensitivitäten von 60-90% demonstriert werden (s. Tabelle 9). In zukünftigen Arbeiten könnte eine Kombination dieser drei Antigene die Sensitivität der Detektion einer akuten Toxoplasmose mittels Western Blot steigern.

Alle Seren, in denen GRA-spezifische IgM-Ak detektiert werden konnten, waren auch für die gleichen Proteine in IgG Analysen positiv-außer zwei von 14 Seren. Eines hatte rGRA9-spezifische IgM-, das andere rMIC5-spezifische IgM-aber beide hatten keine nachweisbaren IgG Ak gegen rGRA9/rMIC5

5.2.3.1 Kreuzreaktivität und Persistenz von IgM-Antikörpern

Im Rahmen des Nachweis` spezifischer IgM-Antikörper kann es aufgrund ihrer niedrigen Affinität zu Kreuzreaktionen kommen. Dies beschreibt die Bindung eines Antikörpers an zwei verschiedene Antigene, die sehr ähnliche Bindungsstellen (Epitope) besitzen, an die sich der

Antikörper anheften kann. So können nach einer Infektion mit anderen Erregern beispielsweise der Gattung *Neospora*, *Sarcocystis* oder *Besnoitia* kreuzreaktive Antikörper gegenüber *T. gondii* Antigenen beobachtet werden (Lind *et al.*, 1997). Die genannten Vertreter der Untergattung *Eimeriina* sind genetisch eng mit *T. gondii* verwandt (Schulzig *et al.*, 2004). Wegen der generell niedrigeren Affinität bei höherer Avidität sind Kreuzreaktionen von IgM- Antikörpern häufiger zu beobachten.

Ferner kann die Reaktion von spezifischem IgG mit dem Rheumafaktor (RF) falsch-positive IgM Ergebnisse im IFT und ELISA verursachen (Hyde *et al.*, 1975; Naot *et al.*, 1981). Hierbei interagiert der Rheumafaktor, der meist ein Antikörper der Immunglobulinklasse M ist, mit dem Fc-Fragment eines IgG-Antikörpers. So kann es bei Bindung eines spezifischen IgG's an das entsprechende *T. gondii*-Antigen zur Anheftung des Rheumafaktors an den Fc-Teil des spezifischen IgG-Ak kommen. Im IFT oder ELISA kann der Zweitantikörper dann an den IgM-Rheumafaktor binden und der Nachweis von spezifischem IgM zu falsch positiven Ergebnissen führen. Eine Möglichkeit diesen Mechanismus außer Gang zu setzen wäre die Zugabe von anti-IgG-Antikörpern. Die dabei entstehenden Immunkomplexe werden dann vom RF erkannt und können durch Zentrifugation entfernt werden. Dadurch können falsch positive Serologiebefunde durch den Rheumafaktor vermieden werden

Die bereits beschriebene Persistenz Parasiten- spezifischer IgM-Antikörper kann bis zu mehrere Jahre andauern (Correa *et al.*, 2007). Somit könnte die Detektion persistierender IgM-Antikörper gegen *T. gondii* zu einer falschen Interpretation führen (Bessières *et al.*, 1992). Dies bedeutet, dass der alleinige positive Nachweis spezifischer IgM-Antikörper nicht beweisend für eine frische Infektion ist. (Groß *et al.*, 2001).

Darüber hinaus müssen IgM-Antikörper nicht immer im Rahmen einer frischen Infektion vorhanden sein (Bessières *et al.*, 1992).

5.2.4 Detektion spezifischer IgA- Antikörper gegen rekombinante *T. gondii*- Proteine zur Erkennung einer akuten Toxoplasmose

Im Falle einer akuten Infektion mit *T. gondii* werden IgA-Antikörper meist einen Monat nach Erstinfektion gebildet, erreichen ihr Maximum nach zwei bis drei Monaten und sind nach vier bis sieben Monaten nicht mehr nachweisbar. Somit persistieren IgA-Antikörper im Gegensatz zu IgM-Antikörpern nicht. Daher gewinnt der Nachweis spezifischer IgA zur Diagnosestellung einer akut erworbenen Toxoplasmose sowie einer kongenitalen Toxoplasmose an Bedeutung (Bessières *et. al*, 1992). Bedauerlicherweise können IgA-Antikörper im Falle einer

akuten Toxoplasmose nicht immer nachgewiesen werden. Jedoch kann das Vorhandensein spezifischer IgA in Kombination mit spezifischen IgM auf eine akute Infektion hinweisen.

Paul *et al.*, 2001 untersuchte unter Verwendung von Guthrie Testkarten das Blut von Neugeborenen aus Polen auf das Vorliegen von SAG1-spezifischem IgM und IgA im ELISA. Im Falle eines positiven Nachweises wurde neonatales und maternales Blut asserviert und mittels handelsüblichen Testsystemen (PLATELIA TOXO IgM, IgA, and IgG; Sanofi Diagnostics Pasteur) auf das Vorhandensein von spezifischen IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern untersucht. Bei positivem Befund wurden die Seren nochmals nach vier Wochen mittels ELISA und Western Blot auf das Vorhandensein spezifischer IgG, IgM und IgA untersucht und anschließend alle zwei Monate. Paul zeigte, dass die Kombination der IgM- und IgA-Detektion mittels ELISA hierbei eine Sensitivität von 95% sowie eine Spezifität von 99,9% erreichen kann und sich zur Diagnosestellung einer kongenitalen Toxoplasmose eignen kann.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden 14 Seren, die im ISAGA-Test positiv vorgetestet waren, hinsichtlich des Vorhandenseins spezifischer IgA-Antikörper untersucht.

Für rGRA2, rGRA6 und rGRA7 konnten spezifische IgA-Antikörper in 46, 44 und 36% detektiert werden (s. Tabelle 10).

Auch Hotop, 2012 untersuchte 23 Seren von akut Infizierten und konnte spezifische IgA-Antikörper detektieren. Sie beschrieb, dass das Vorhandensein spezifischer IgA-Antikörper gegen rGRA2 sich besser eignet, um zwischen akuter und chronischer Toxoplasmose zu differenzieren, als das alleinige Vorhandensein von IgM-Antikörpern.

Die geringe Nachweisfrequenz der IgA-Detektion in der hier vorliegenden Arbeit könnte in weiteren Arbeiten durch eine Kombination mehrerer Antigene gesteigert werden.

Desweiteren beschrieb Hotop, 2012, dass sie für die Detektion Antigen-spezifischer IgA-Antikörper im Lineblot eine verlängerte Inkubationszeit im Gegensatz zur IgM- und IgG-Detektion verwendete, um eine bessere Detektionsrate zu erzielen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch für alle Immunglobulin-Subklassen die gleiche Inkubationsdauer angewandt und es ist möglich, dass dies zu einer falsch niedrigen IgA-Nachweisfrequenz geführt hat. In weiteren Analysen wäre es daher sinnvoll auch in den klassischen WB-Analysen für IgA unterschiedliche Inkubationszeiten auszutesten.

Saadatnia *et al.*, 2012 untersuchte 145 Seren: 75 Seren von Patienten mit akuter Toxoplasmose, 20 Seren von Patienten mit chronischer Toxoplasmose, 20 Toxoplasmose-negative und 30 von Patienten, die negativ für eine Infektion mit *T. gondii* getestet waren aber andere Infektionen hatten. Sie verwendete Lysat von *T. gondii* und setzte es in Western Blot-Analysen ein. Hierbei konnte sie *T. gondii*-spezifische IgM- und IgA-Antikörper gegen

ein 20 kDA-Protein detektieren, welches mittels Massenspektrometrie und Proteinanalysen als GRA7 oder MIC10 identifiziert wurde. In Seren von Patienten mit akuter Toxoplasmose konnte sie in 75% spezifische IgM- und in 44% spezifische IgA-Ak gegen dieses Protein nachweisen. Durch Kombination des Nachweises 20kDA-spezifischer IgM und/oder IgA konnte sie die Sensitivität des Nachweises einer akuten Infektion mit *T. gondii* auf 78,7% steigern. Dieser kombinierte Nachweis von spezifischem IgM und/oder IgA zur Detektion einer akuten *T. gondii*-Infektion scheint gerade in Hinblick auf die unterschiedliche Kinetik dieser beiden Immunglobuline sinnvoll: Während IgM- Antikörper-Spiegel mehrere Monate erhöht bleiben und teilweise auch persistieren können (s. Kapitel 5.2.3.1), fallen IgA-Antikörper-Spiegel bereits nach einigen Monaten nach akuter Infektion ab und werden zudem seltener im Serum *T. gondii*-negativer Individuen detektiert (Martin *et al.*, 1998).

Arbeit	rGra1	rGra2	rGra6	rGra7	rGra9	rMic5	Toxoplasmose (Anzahl untersuchter Seren)
Vorliegende Arbeit (Western Blot, His ₆ -Fusionsproteine)	0%	46%	44%	36%	8%	0%	ISAGA>1:6400(14)
	18%	36%	9%	9%	0%	0%	Chronisch (11)
	8%	8%	8%	8%	15%	0%	Gruppe 1(13)
Saadatnia 2012 (Western Blot, T.g.-Lysat)				44%			Akut(75)
				40%			Chronisch(10)
				30%			Negativ(20)

Tabelle 10: spezifische IgA-Detektion gegen die in dieser Arbeit untersuchten Antigene im Vergleich mit anderen Arbeiten

5.3 Konnatale Toxoplasmose

Die Folgen einer konnatalen Infektion mit *T. gondii* können für das Ungeborene von einer leichten Entwicklungsretardierung bis hin zu einer schwerwiegenden Infektion mit Retinochorioiditis, Ventrikulomegalie oder/und Hydrozephalus reichen. Die diaplazentare Transmission nimmt im Laufe der Schwangerschaft zu, jedoch nimmt die Schwere der Infektion im Verlauf ab (Goldstein *et al.*, 2008). Somit zeigen sich die schwerwiegendsten klinischen Manifestationen bei einer Erstinfektion der Mutter im ersten Trimenon (Lopes, Fabiana Maria Ruiz *et al.*, 2007).

Um eine konnatale Toxoplasmose beim Neugeborenen zu diagnostizieren, muss man zwischen den von der Mutter diaplazentar übertragenen Leihantikörpern und den vom Säugling eigens produzierten Immunglobulinen differenzieren. Der von der Mutter auf das

Neugeborene übertragene Leih-titer besteht aus Immunglobulinen der Klasse G. Hat sich das Kind in der Schwangerschaft im Rahmen einer konnatalen Toxoplasmose infiziert, wird es, sobald es dazu in der Lage ist, spezifische Antikörper bilden.

Zur Unterscheidung zwischen Leihantikörper versus selbst produzierten Antikörpern kann man den IFT-Titer heran ziehen. Ist der IFT-Titer des Neugeborenen beispielsweise höher als der der Mutter, steigt er in Verlaufskontrollen oder fällt nach der Geburt nicht ab, kann man von einer eigenen Antikörperproduktion des Neugeborenen ausgehen.

Außerdem kann eine qualitative Analyse der im kindlichen Serum enthaltenen Antikörper gegen die Toxoplasmenantigene zugrunde gelegt werden. Vergleicht man hierbei neonatales und mütterliches Serum und beide enthalten Antikörper gegen die gleichen Antigene, ist von einem Leih-titer auszugehen. Sind im kindlichen Serum Antikörper gegen andere Antigene als im mütterlichen Serum nachweisbar, ist von einer Eigensynthese auszugehen.

Um zwischen einem Leih-titer und einer konnatal erworbenen Toxoplasmose zu differenzieren, haben wir die Seren von einer *T. gondii*-positiven Mutter und dem zugehörigen Säugling mittels Western Blot untersucht.

Das mütterliche Serum zeigte einen IFT-Titer von 1:256, das neonatale von 1:128. Hierbei ist davon auszugehen, dass eine quantitativ ähnliche IgG-Detektion im IFT in mütterlichem und neonatalem Serum auf einen Leih-titer hinweist. Zeigt das Neugeborene eine akute Toxoplasmose, würde die Analyse seines Serums mittels Western Blot unter Umständen Toxoplasmen-spezifische IgM oder IgA enthalten. Dies war in unseren Untersuchungen nicht der Fall.

Außerdem konnte mittels Immunoblot in beiden Seren rGRA1-, rGRA2-, rGRA6-, rGRA7 sowie rGRA9-spezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Somit sind die Antikörper qualitativ im kindlichen Serum identisch, was die Vermutung eines Leih-titers bestärkt.

Desweiteren ist bei einer Neuinfektion des Neugeborenen davon auszugehen, dass im Serum andere Antigen-spezifische IgG-Muster als die im mütterlichen Serum nachzuweisen wären. Auch dies zeigte sich nicht in unseren Analysen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich der Western Blot aufgrund seiner Sensitivität auch eignet einen „Leih-titer“ von einer akuten Neuinfektion des Neugeborenen zu unterscheiden.

5.3.1 Infektionswege einer konnatalen Toxoplasmose und Pathogenität im Rahmen einer Reinfektion

Bereits 1995 wurden drei verschiedene Genotypen von *T. gondii* beschrieben. Diese Genotypen unterscheiden sich bezüglich ihrer Virulenz im Mausmodell, wobei Genotyp I als hoch virulent, Genotyp II als intermediär und Genotyp III als wenig virulent beschrieben wurden. In 95% der isolierten und genotypisierten Parasiten in Nordamerika und Europa waren diese drei Genotypen wiederzufinden. Die verbleibenden 5% wurden als atypische *T. gondii*-Stämme bezeichnet (Howe und Sibley, 1995; Su *et al.*, 2010).

In Südamerika gibt es momentan kaum mehr eine klare Differenzierung in Typ I-III-hier überwiegen atypische Stämme. Die Stämme vom Typ I-III zeigen kaum Unterschiede bezüglich ihrer Nukleotidstruktur und es besteht die Annahme, dass sie von einem gemeinsamen Vorfahr abstammen.

Atypische Stämme zeigen je nach Region hingegen eine große genetische Diversität. Hiermit scheint sich *T. gondii* durch klonale als auch sexuelle Fortpflanzung an die jeweilige Umweltbedingungen anzupassen und somit sein Überleben als auch seine Übertragung in verschiedenen Wirten zu sichern (Ajzenberg *et al.*, 2004).

Bislang war die bestehende Annahme, dass eine durchgemachte Infektion mit *T. gondii* immunologisch auch gegen eine Infektion mit einem anderen *T. gondii*- Stamm schützt. Allerdings berichtete Elbez-Rubinstein 2009 über eine Infektion einer bereits immunisierten Schwangeren mit einem atypischen *T. gondii*-Stamm vermutlich durch Verzehr von infiziertem rohem Pferdefleisch. Die Schwangere litt an einer Hashimoto-Thyreoiditis, die teilweise eine Suppression einer Subpopulation von NK-Zellen mit sich bringen kann (Solerte *et al.*, 2005). Somit ist die natürliche immunologische Barriere beispielsweise im Darm geschwächt, was die Manifestation einer Zweitinfektion durch orale Aufnahme des Erregers begünstigt.

Das Neugeborene zeigte postnatal eine Sepsis, die mit einer Dreifach-Antibiose (Ampicillin, Cefotaxim und Gentamycin) behandelt wurde. Es wurden ophthalmologisch mehrere Läsionen im Sinne einer Chorioretinitis des Neugeborenen entdeckt. Nach acht Tagen wurde im Blut des Neugeborenen mittels PCR der Erreger *T. gondii* nachgewiesen. Es wurde ein ISAGA angeschlossen in dem sich Toxoplasmen-spezifische IgM detektieren ließen.

Im Mausmodell konnte Elbez-Rubinstein zeigen, dass chronisch mit *T. gondii* Typ II infizierte Mäuse, die experimentell mit dem aus dem Blut des Neugeborenen isolierten Stamm infiziert wurden, starben, was die hohe Pathogenität dieses atypischen Stammes beweist.

Die frühere Vorstellung, dass eine Zweitinfektion mit *T. gondii* kein klinisch fulminantes Krankheitsbild mit Parasitämie zur Folge hat, konnte damit durch Elbez-Rubinsteins Arbeit widerlegt werden. Sie machte deutlich, dass eine erworbene Immunität durch vorherige Infektion mit einem der drei Hauptgenotypen von *T. gondii* nicht immer vor einer Reinfektion mit einem atypischen *T. gondii*-Stamm schützt (Elbez-Rubinstein *et al.*, 2010).

Lindsay und Dubey *et al.*, 2011 zeigten in Ihrer Arbeit vier Infektionswege auf, die zu einer konnatalen Infektion mit *T. gondii* führen können:

1. Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft und Transmission auf den Fetus (McLeod *et al.*, 2006). Derzeitige medizinische Erkenntnisse stützen sich auf Untersuchungen von Schwangeren aus Europa, die meist mit Genotyp II infiziert sind. Die aktuelle Datenlage beschreibt eine zunehmende Inzidenz von Infektionen im Laufe der Schwangerschaft mit abnehmendem Schweregrad der klinischen Manifestation. Eine konnatale Infektion durch einen atypischen *T. gondii*-Stamm kann allerdings einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf verursachen (Delhaes *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2005)
2. Infektion der Mutter kurz vor der Konzeption mit andauernder Parasitämie, welche auch in den ersten Wochen der Schwangerschaft anhält (Bouhmahni *et al.*, 2004). Derzeit gibt es kaum Daten zur Dauer der Parasitämie bei typischen versus atypischen *T. gondii*-Stämmen.
3. Reaktivierung einer Toxoplasmen-Infektion bei immunkompromittierten Müttern (Bachmeyer *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2010)
4. Schwangere, die durch eine frühere Infektion mit einem typischen *T. gondii*-Stamm (in Europa meist Genotyp II) immunisiert ist, infiziert sich während der Schwangerschaft mit einem atypischen Stamm. (Elbez-Rubinstein *et al.*, 2010)

5.3.2 Mikro-Peptid-Array zur Differenzierung unterschiedlicher Genotypen von *T. gondii*

Derzeitige serologische Tests können zwischen einer Infektion mit einem typischen oder atypischen *T. gondii*-Stamm nicht unterscheiden (Lindsay und Dubey, 2011).

Hierbei könnten Peptid-Mikroarray-Analysen helfen, die die gleichzeitige Analyse von mehreren Antigenen oder deren Epitope erlauben. Vorab synthetisierte Peptide können beispielsweise im Rahmen einer Drucktechnik als nanoliter-große Tröpfchen auf einen Peptid-Mikroarray-Slide „geprintet“ werden. Dies hat den Vorteil, dass einmalig synthetisierte

Peptide immer wieder auf ein neues Peptid-Mikroarray-Slide „geprintet“ werden können (Maksimov, 2013).

In der Arbeit von Maksimov *et al.*, 2012 wurden 38 Peptide synthetisiert, die Epitope *T. gondii*-spezifischer Antigene (GRA1, GRA2, GRA4, MIC3, u.a.) darstellen. Um den diagnostischen Nutzen dieser Epitope für zukünftige serologische Analysen zu untersuchen, verwendete man ein Peptid-Mikro-Array. Es wurden 184 humane Seren, die in Vortests positiv für eine Infektion mit *T. gondii* gewertet wurden, untersucht. Zehn Peptide zeigten ein signifikantes Potential zur Detektion einer akuten Toxoplasmose.

Maksimov zeigte mittels Peptid-Mikroarray eine Testsensitivität von 100% bei Patienten mit okkulärer Toxoplasmose (n=10), von 86% bei Patienten mit akuter Toxoplasmose (n=21), von 81% bei Patienten mit chronischer Toxoplasmose (n=53) sowie von 57% bei seropositiven Forstarbeitern (n=100). Die Untersuchung 140 *T. gondii*-negativer Seren auf diese zehn Peptide mittels Peptid-Mikro-Array zeigte eine diagnostische Spezifität von 84%.

In einer weiteren Arbeit von Maksimov *et al.*, 2012 wurden 54 Peptide unterschiedlicher *T. gondii* –Genotypen in einem Peptid-Mikro-Array analysiert. Es wurden hierfür 21 Seren von Patienten mit akuter Toxoplasmose, 53 Seren von Individuen mit chronischer Toxoplasmose und 100 Seren sero-positiver Forstarbeiter untersucht.

71% der Seren zeigten eine Reaktion mit Peptiden des Genotyps II, was sich mit genotypisierten Oozysten aus dieser Region deckte. Typ I- und Typ III-Peptide wurden in 42 und 16% der Seren erkannt. In Maksimovs Arbeit zeigten 13% der Seren keine Reaktion auf Typ-spezifische Peptide. Insgesamt reagierten die Seren der Patienten mit akuter Toxoplasmose mit einer statistisch signifikant größeren Anzahl von Peptiden als chronisch Infizierte oder Forstarbeiter.

In weiteren Analysen muss geklärt werden, wie vollständig die Kreuzreaktivität der Seren mit Antigenen von typischen und atypischen *T. gondii*-Stämmen ist.

6. Literaturverzeichnis

Adjogble, K. D., Mercier, C., Dubremetz, J. F., Hucke, C., MacKenzie, C. R., Cesbron-Delauw, M. F., & Däubener, W. (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *International journal for parasitology*, 34(11), 1255-1264.

Ahn, H. J., Kim, S., Kim, H. E., & Nam, H. W. (2006). Interactions between secreted GRA proteins and host cell proteins across the parasitophorous vacuolar membrane in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *The Korean journal of parasitology*, 44(4), 303-312.

Ailyati, A. (2005). B4: Ein neues Antigen von *Toxoplasma gondii* mit "coiled-coil"-Struktur: Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung. *Inaugural-Dissertation, unveröffentlicht*.

Ajzenberg, D., Banuls, A. L., Su, C., Dumetre, A., Demar, M., Carne, B., & Dardé, M. L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 34(10), 1185-1196.

Ali-Heydari, S., Keshavarz, H., Shojaee, S., & Mohebbali, M. (2013). Diagnosis of antigenic markers of acute toxoplasmosis by IgG avidity immunoblotting. *Parasite*, 20, 18.

Ambroise-Thomas, P., Pelloux, H. (1993). Toxoplasmosis-congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol. Today*, 9, 61-63.

Andrews, C. D., Dubey, J. P., Tenter, A. M., & Webert, D. W. (1997). *Toxoplasma gondii* recombinant antigens H4 and H11: use in ELISAs for detection of toxoplasmosis in swine. *Veterinary parasitology*, 70(1-3), 1-11.

Asai, T., Miura, S., Sibley, L. D., Okabayashi, H., & Takeuchi, T. (1995). Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11391-11397.

Aubert, D., Maine, G. T., Villena, I., Hunt, J. C., Howard, L., Sheu, M., ... & Pinon, J. M. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and

immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1144-1150.

Azevedo, K. M. L. D., Setúbal, S., Lopes, V. G. S., Camacho, L. A. B., & Oliveira, S. A. D. (2010). Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(2), 186-189

Bachmeyer, C., Mouchnino, G., Thulliez, P., & Blum, L. (2006). Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. *Journal of Infection*, 52(2), e55-e57.

Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P., & Cowman, A. F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 621-628.

Bermudes, D., Peck, K. R., Afifi, M. A., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 29252-29260.

Bessieres, M. H., Roques, C., Berrebi, A., Barre, V., Cazaux, M., & Seguela, J. P. (1992). IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *Journal of clinical pathology*, 45(7), 605-608.

Bohne, W., Heesemann, J., & Gross, U. (1993). Coexistence of heterogeneous populations of *Toxoplasma gondii* parasites within parasitophorous vacuoles of murine macrophages as revealed by a bradyzoite-specific monoclonal antibody. *Parasitology research*, 79(6), 485-487.

Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D. J., & Heesemann, J. (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Molecular microbiology*, 16(6), 1221-1230.

Bohne W., Holpert, M., Gross, U. (1999). Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology*. 20, 248-254. Review.

Boothroyd, J. C., & Dubremetz, J. F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 79-88.

Boumahni, B., Randrianivo, H., Flodrops, H., Kauffmann, E., Sauve, F., Chauvet, O., ... & Fourmaintraux, A. (2004). [Maternal toxoplasmosis before conception and chorioretinitis in twin sisters]. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, 33(3), 248-250.

Brydges, S. D., Sherman, G. D., Nockemann, S., Loyens, A., Däubener, W., Dubremetz, J. F., & Carruthers, V. B. (2000). Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 111(1), 51-66.

Brydges, S. D., Zhou, X. W., Huynh, M. H., Harper, J. M., Mital, J., Adjogble, K. D., ... & Carruthers, V. B. (2006). Targeted deletion of MIC5 enhances trimming proteolysis of *Toxoplasma* invasion proteins. *Eukaryotic cell*, 5(12), 2174-2183.

Brydges, S. D., Harper, J. M., Parussini, F., Coppens, I., & Carruthers, V. B. (2008). A transient forward-targeting element for microneme-regulated secretion in *Toxoplasma gondii*. *Biology of the Cell*, 100(4), 253-264.

Carey, K. L., Donahue, C. G., & Ward, G. E. (2000). Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 105(1), 25-37.

Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European journal of cell biology*, 73(2), 114-123.

Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology*, 31(2), 421-428.

Carruthers, V. B. (2002). Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta tropica*, 81(2), 111-122.

Carruthers, V. B., & Suzuki, Y. (2007). Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophrenia bulletin*, 33(3), 745-751.

Cesbron-Delauw, M. F. (1994). Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitology Today*, 10(8), 293-296.

Charron, A. J., & Sibley, L. D. (2004). Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic*, 5(11), 855-867.

Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P. I., Striepen, B., ... & Joiner, K. A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2424-2431.

Ching, X. T., Lau, Y. L., Fong, M. Y., & Nissapatorn, V. (2013). Evaluation of *Toxoplasma gondii*-recombinant dense granular protein (GRA2) for serodiagnosis by western blot. *Parasitology research*, 112(3), 1229-1236.

Coppin, A., Dzierszinski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Ferguson, D., Tomavo, S. (2003). Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie*. 85, 353-361.

Däubener, W., & Hadding, U. (1997). Cellular immune reactions directed against *Toxoplasma gondii* with special emphasis on the central nervous system. *Medical microbiology and immunology*, 185(4), 195-206.

Däubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K. S., & Schroten, H. (2001). Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Infection and immunity*, 69(10), 6527-6531.

Darcy, F. R. A. N. C. O. I. S. E., Maes, P. I. E. R. R. E. T. T. E., Gras-Masse, H. E. L. E. N. E., Auriault, C. L. A. U. D. E., Bossus, M. A. R. C., Deslee, D. I. D. I. E. R., ... & Capron, A. (1992). Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic

peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *The Journal of Immunology*, 149(11), 3636-3641.

Delhaes, L., Ajzenberg, D., Sicot, B., Bourgeot, P., Dardé, M. L., Dei-Cas, E., & Houfflin-Debauge, V. (2010). Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenatal diagnosis*, 30(9), 902-905.

Denton, H., Roberts, C. W., Alexander, J., & Coombs, G. H. (1996). Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS microbiology letters*, 137(1), 103-108.

Desmots, G., Couvreur, J. (1974). Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.* 290, 1110-1116.

Desmots, G., Naot, Y., & Remington, J. S. (1981). Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(5), 486-491.

Ding, M., Kwok, L. Y., Schlüter, D., Clayton, C., & Soldati, D. (2005). The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Molecular Microbiology*, 58(3), 915-915.

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

Dobrowolski, J. M., Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1997). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology*, 26(1), 163-173.

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

Dubremetz, J. F., & Torpier, G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *Journal of ultrastructure research*, 62(2), 94-109.

Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., & Joiner, K. A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitology research*, 79(5), 402-408.

Elbez-Rubinstein, A., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Cohen, R., Dumètre, A., Yera, H., ... & Thulliez, P. (2009). Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *Journal of Infectious Diseases*, 199(2), 280-285.

El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S. T., Vial, H., Labesse, G., & Dubremetz, J. F. (2007). ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLOS pathog*, 3(2), e14.

Erlich, H. A., Gelfand, D., & Sninsky, J. J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252(5013), 1643-1652.

Fentress, S. J., Behnke, M. S., Dunay, I. R., Mashayekhi, M., Rommereim, L. M., Fox, B. A., ... & Townsend, R. R. (2010). Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell host & microbe*, 8(6), 484-495.

Ferguson, D. J., Hutchison, W. M. (1987). An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* 73, 483-491.

Ferrandiz, J., Mercier, C., Wallon, M., Picot, S., Cesbron-Delauw, M. F., & Peyron, F. (2004). Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11(6), 1016-1021.

Foudrinier, F., Villena, I., Jaussaud, R., Aubert, D., Chemla, C., Martinot, F., & Pinon, J. M. (2003). Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked

immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 41(4), 1681-1686.

Frenkel, J. K., Dubey, J. P., Miller, N. L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. 167, 893-896.

Frenkel, J. K. (1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today*. 4, 273-278.

Freyre, A., Dubey, J. P., Smith, D. D., Frenkel, J. K. (1989). Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J. Parasitol.* 75, 750-755.

Friese, K. (1995). Toxoplasmose und Schwangerschaft. *Toxoplasmose-Erreger und Krankheit"*, Pohle, HD; Remington, JS (Hrsg.), *Socio-medico Verlag, Gräfelfing*, 2, 122-129.

Fuhrman, S. A., & Joiner, K. A. (1989). *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement-mediated killing. *The Journal of Immunology*, 142(3), 940-947.

Giese, A. (2004). *Immunantwort ex-vivo differenzierter Dendritischer Zellen bei Infektion mit dem intrazellulären Parasiten Toxoplasma gondii* (Doctoral dissertation, Universität Oldenburg).

Gigley, J. P., Bhadra, R., & Khan, I. A. (2011). CD8 T cells and *Toxoplasma gondii*: a new paradigm. *Journal of parasitology research*, 2011.

Goldstein, E. J., Montoya, J. G., & Remington, J. S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, 47(4), 554-566.

Golkar, M., Rafati, S., Abdel-Latif, M. S., Brenier-Pinchart, M. P., Fricker-Hidalgo, H., Sima, B. K., ... & Mercier, C. (2007). The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 58(4), 419-426.

Golkar, M., Azadmanesh, K., Khalili, G., Khoshkholgh-Sima, B., Babaie, J., Mercier, C., Brenier-Pinchart, M. P., Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., Cesbron-Delauw, M. F. (2008). Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women using

enzyme-linked immunosorbent assays with a recombinant dense granule GRA6 protein. *Diagn Microbiol Infect Dis* **61**: 31-9.

Gratzl, R., Sodeck, G., Platzer, P., Jäger, W., Graf, J., Pollak, A., & Thalhammer, T. (2002). Treatment of toxoplasmosis in pregnancy: concentrations of spiramycin and neospiramycin in maternal serum and amniotic fluid. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, *21*(1), 12-16.

Gross, U., Bohne, W. (1994). *Toxoplasma gondii*: Strain- and Host Cell Dependent Induction of Stage differentiation. *J. Euk. Microbiol.* *41*, 10S-11S.

Gross, U., Bohne, W., Soète, M., & Dubremetz, J. F. (1996). Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Today*, *12*(1), 30-33.

Gross, U., Roos, T., & Friese, K. (2001). Toxoplasmose in der Schwangerschaft. *Dtsch Arztebl*, *98*(49), 49.

Gross, U. (2004). Prävalenz und Public-Health-Aspekte der Toxoplasmose. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, *47*(7), 692-697.

Guérardel, Y., Leleu, D., Coppin, A., Liénard, L., Slomianny, C., Strecker, G., ... & Tomavo, S. (2005). Amylopectin biogenesis and characterization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, the intracellular development of which is restricted in the HepG2 cell line. *Microbes and infection*, *7*(1), 41-48.

Håkansson, S., Charron, A. J., & Sibley, L. D. (2001). *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The EMBO journal*, *20*(12), 3132-3144.

Harper, J. M., Huynh, M. H., Coppens, I., Parussini, F., Moreno, S., & Carruthers, V. B. (2006). A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2–M2AP invasion complex. *Molecular biology of the cell*, *17*(10), 4551-4563.

Herrmann, D. C. (2012). *Molecular typing of Toxoplasma gondii isolates from cats and humans in Germany* (Doctoral dissertation, Humboldt Universität zu Berlin).

Hill, D. E., Chirukandoth, S., & Dubey, J. P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*, 6(01), 41-61.

Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Pietkiewicz, H., Holec, L., Gasior, A., Myjak, P. (2005). Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Acta Parasitol.* **50**: 249-54.

Holec-Gasior, L., Kur, J., Hiszczyńska-Sawicka, E. (2009). GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol* **16**: 510-4.

Holec-Gasior, L. (2013). *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis—the current status of studies. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI-00117.

Hotop, A. (2012). Epidemiologische Untersuchungen zur Toxoplasmose und Identifizierung immunogener parasitärer Antigene

Hotop, A., Buschtöns, S., Bangoura, B., Zöller, B., Koethe, M., Spekker-Bosker, K., ... & Groß, U. (2014). Humoral immune responses in chickens and turkeys after infection with *Toxoplasma gondii* by using recombinant antigens. *Parasitology research*, 113(4), 1473-1480.

Howe, D. K., Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561-1566.

Hu, K., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of cell biology*, 156(6), 1039-1050.

Huynh, M. H., & Carruthers, V. B. (2006). *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog*, 2(8), e84.

Hyde, B., Barnett, E.V., Remington, J.S. (1975). Method for differentiation of nonspecific from specific toxoplasma IgM fluorescent antibodies in patients with rheumatoid factor. Society for Experimental Biology and Medicine (New York)

Israelski, D. M., Remington, J. S. (1993b). Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* 2, 423-435.

Jacobs, L., Remington, J. S., Melton, M. L. (1960). The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 46, 11-21.

Jacobs, D., Dubremetz, J. F., Loyens, A., Bosman, F., Saman, E. (1998). Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 91: 237-49.

Jacobs, D., Vercammen, M., & Saman, E. (1999). Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(1), 24-29.

Johnsen, J. (2012). *Erregerstämme und klinische Ausprägung der Okulären Toxoplasmose* (Doctoral dissertation, Freie Universität Berlin).

Joiner, K. A., Dubremetz, J. F. (1993). *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect. Immun.* 61, 1169-1172. Review.

Joiner, K. A., & Roos, D. S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol*, 157(4), 557-563.

Karsten, V., Qi, H., Beckers, C. J., Reddy, A., Dubremetz, J. F., Webster, P., & Joiner, K. A. (1998). The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *The Journal of cell biology*, 141(6), 1323-1333.

Kasper, L. H. (1989). Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, 57(3), 668-672.

Khan, A., Su, C., German, M., Storch, G. A., Clifford, D. B., & Sibley, L. D. (2005). Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5881-5887.

Kaye, A. (2011). Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care*. 6, 355-64.

Kirchner, H., Kruse, A., Neustock, P., & Rink, L. (1993). Cytokine und Interferone. *Heidelberg, Spektrum*.

Koppe, J. G., Loewer-Sieger, D. H., de Roever-Bonnet, H. (1986). Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet*. 1, 254-256.

Kotresha, D., & Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *Apmis*, 118(8), 529-542.

Kotresha, D., Poonam, D., Muhammad Hafiznur, Y., Saadatinia, G., Nurulhasanah, O., Sabariah, O., ... & Rahmah, N. (2012). Recombinant proteins from new constructs of SAG1 and GRA7 sequences and their usefulness to detect acute toxoplasmosis. *Trop Biomed*, 29(1), 129-137.

Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C., & Sibley, L. D. (1999). Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 102(2), 311-324.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.

Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., ... & Kocken, C. H. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog*, 7(2), e1001276.

Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Molecular Biology of the Cell*, 10(4), 1277-1287.

Lecordier,L., Fourmaux,M-P., Mercier,C., Dehecq,E., Masy, E., Cesbron-Delauw, M.-F. (2000) Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using the Recombinant Dense Granule Antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies, *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7(4): 607–611.

Lekutis, C., Ferguson, D. J., Grigg, M. E., Camps, M., & Boothroyd, J. C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International journal for parasitology*, 31(12), 1285-1292.

Levine, N. D. (1980). Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66, 830-834.

Lieberman, L. A., & Hunter, C. A. (2002). The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *International reviews of immunology*, 21(4-5), 373-403.

Liesenfeld, O., Press, C., Montoya, J. G., Gill, R., Isaac-Renton, J. L., Hedman, K., & Remington, J. S. (1997). False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *Journal of clinical microbiology*, 35(1), 174-178.

Liesenfeld, O. (1999). Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology*, 201(2), 229-239.

Lind, P., Haugegaard, J., Wingstrand, A., Henriksen, S.A. The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol.* 1997;71:1-15.

Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (2011) *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis *Parasitology* 14,1829-31

Lindsay, D. S., Dubay, J. P., Blagburn, B. L., Toivio-Kinnucan, M. (1991). Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites and sporozoites. *J. Parasitol.* 77, 126-132.

Lopes FM, Gonçalves DD, Mitsuka-Breganó R, Freire RL, Navarro IT. (2007). *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *The Brazilian Journal of infectious disease* 11,5:496-506

Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N., & Sibley, L. D. (2002). *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca²⁺ release from inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP₃)/ryanodine-sensitive stores. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25870-25876.

Lovett, J. L., & Sibley, L. D. (2003). Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *Journal of cell science*, 116(14), 3009-3016.

Luft, B. J., Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15, 211-222.

Luft, B. J., Hafner, R., Korzun, A. H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E. M., Bourland, D. D., 3rd, Uttamchandani, R., Fuhrer, J., Jacobson, J., et al., (1993). Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 007p/ANRS 009 Study Team. *N. Engl. J. Med.* 329, 995-1000.

Lyons, R. E., McLeod, R., & Roberts, C. W. (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. *Trends in parasitology*, 18(5), 198-201.

Magor, K. E. (2011). Immunoglobulin genetics and antibody responses to influenza in ducks. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(9), 1008-1017.

Maksimov, P., Zerweck, J., Maksimov, A., Hotop, A., Groß, U., Spekker, K., ... & Mertens, M. (2012). Analysis of clonal type-specific antibody reactions in *Toxoplasma gondii* seropositive humans from Germany by peptide-microarray. *PloS one*, 7(3), e34212.

Maksimov, P., Zerweck, J., Maksimov, A., Hotop, A., Groß, U., Pleyer, U., ... & Petri, E. (2012). Peptide microarray analysis of in silico-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(6), 865-874.

Maksimov, P. (2013). *Peptid-Mikroarray-basierte serologische Diagnose und Typisierung von Toxoplasma gondii-Infektionen bei Menschen und Katzen in Deutschland* (Doctoral dissertation, Freie Universität Berlin).

Martin, V., Arcavi, M., Santillan, G., Amendoeira, M. R. R., Neves, E. D. S., Griemberg, G., ... & Angel, S. O. (1998). Detection of human Toxoplasma-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant Toxoplasma gondii rop2 protein. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(5), 627-631.

Mashayekhi, M., Sandau, M. M., Dunay, I. R., Frickel, E. M., Khan, A., Goldszmid, R. S., ... & Murphy, K. M. (2011). CD8 α ⁺ dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by Toxoplasma gondii tachyzoites. *Immunity*, 35(2), 249-259.

McCabe, R., Remington, J. S. (1988). Toxoplasmosis: the time has come. *N. Engl. J. Med.* 318, 313-315.

McLeod, R., Boyer, K., Karrison, T., Kasza, K., Swisher, C., Roizen, N., ... & Mets, M. (2006). Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981–2004: the national collaborative Chicago-based, congenital toxoplasmosis study. *Clinical Infectious Diseases*, 42(10), 1383-1394.

Mehlhorn, H. (2012). *Die Parasiten des Menschen: Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen*. Springer-Verlag.

Melo, M. B., Jensen, K. D., & Saeij, J. P. (2011). Toxoplasma gondii effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends in parasitology*, 27(11), 487-495.

Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., & Sibley, L. D. (1998). The amphipathic alpha helices of the Toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *Journal of cell science*, 111(15), 2171-2180.

Mercier, C., Dubremetz, J. F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M. F. (2002). Biogenesis of Nanotubular Network in Toxoplasma Parasitophorous Vacuole Induced by Parasite Proteins. *Molecular biology of the cell*, 13(7), 2397-2409.

Mercier, C., & Cesbron-Delauw, M. F. (2015). Toxoplasma secretory granules: one population or more?. *Trends in parasitology*, 31(2), 60-71.

Meyer-Wittkopf, M. (2013). Fetale Infektionen. In *Ultraschalldiagnostik in Geburtshilfe und Gynäkologie* (pp. 601-617). Springer Berlin Heidelberg.

Michelin, A., Bittame, A., Bordat, Y., Travier, L., Mercier, C., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2009). GRA12, a Toxoplasma dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *International journal for parasitology*, 39(3), 299-306.

Mineo, J. R., McLeod, R., Mack, D., Smith, J., Khan, I. A., Ely, K. H., & Kasper, L. H. (1993). Antibodies to Toxoplasma gondii major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *The Journal of Immunology*, 150(9), 3951-3964.

Montoya, J. G. (2002). Laboratory diagnosis of Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis. *Journal of Infectious Diseases*, 185(Supplement 1), S73-S82.

Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., & Sibley, L. D. (1999). Invasion by Toxoplasma gondii establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12), 1783-1792.

Morris, M. T., Coppin, A., Tomavo, S., & Carruthers, V. B. (2002). Functional analysis of Toxoplasma gondii protease inhibitor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45259-45266.

Morrisette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in Toxoplasma gondii. *Journal of cell science*, 115(5), 1017-1025.

Nam, H. W. (2009). GRA proteins of Toxoplasma gondii: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *The Korean journal of parasitology*, 47(Suppl), S29.

Naot, Y., Barnett, E.V., Remington J.S. (1981) Method for avoiding false-positive results occurring in immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays due to presence of both rheumatoid factor and antinuclear antibodies. *J Clin Microbiol.* 1981 Jul; 14(1): 73–78.

Naujoks, B. (2008). Inhibierung der Toxoplasma-gondii-Replikation durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette. *Zentrum Hygiene und Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.*

Nicolle, C., Manceaux, L. (1908). Sur un protozoaire nouveau du gondi. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 148, 369-372.

Nigro, M., Gutierrez, A., Hoffer, A. M., Clemente, M., Kaufer, F., Carral, L., ... & Angel, S. O. (2003). Evaluation of Toxoplasma gondii recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 47(4), 609-613.

Nischik, N. (2003). *Immunogenität des virulenzabhängig exprimierten dense granule Proteins GRA7 von Toxoplasma gondii* (Doctoral dissertation).

Nockemann, S., Dlugonska, H., Henrich, B., Kitzerow, A., & Däubener, W. (1998). Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted–secreted antigen (ESA) from Toxoplasma gondii. *Molecular and biochemical parasitology*, 97(1), 109-121.

Opitz, C., & Soldati, D. (2002). ‘The glideosome’: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by Toxoplasma gondii. *Molecular microbiology*, 45(3), 597-604.

Ortega-Barria, E., & Boothroyd, J. C. (1999). A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1267-1276.

Ossorio, P. N., Dubremetz, J. F., & Joiner, K. A. (1994). A soluble secretory protein of the intracellular parasite Toxoplasma gondii associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15350-15357.

Paul, M., Petersen, E., & Szczapa, J. (2001). Prevalence of Congenital *Toxoplasma gondii* Infection among Newborns from the Poznań Region of Poland: Validation of a New Combined Enzyme Immunoassay for *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin A and Immunoglobulin M Antibodies. *Journal of clinical microbiology*, 39(5), 1912-1916.

Petersen, E., Salt, A., Freeman, K., Prusa, A., Ferret, N., Buffolano, W., ... & Gilbert, R. (2005). European Multicentre study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Determinants of response to a parent questionnaire about development and behaviour in 3 years olds. *Bmc Pediatr*.

Petersen, E. K. (1979). Destruction of *Toxoplasma gondii* by HC1 solution. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [B]*. 87, 217-220.

Pfreppe, K. I., Enders, G., Gohl, M., Krczal, D., Hlobil, H., Wassenberg, D., & Soutschek, E. (2005). Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 12(8), 977-982.

Piergili, F. D. (2004). [Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals]. *Parassitologia*, 46(1-2), 177-181.

Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H. V., Stankiewicz, M., ... & Myjak, P. (2004). Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1779-1781.

Pinon, J. M., Chemla, C., Villena, I., Foudrinier, F., Aubert, D., Puygauthier-Toubas, D., ... & Trenque, T. (1996). Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *Journal of clinical microbiology*, 34(3), 579-583.

Pohl, F. U. (2002). *Der Einfluß von Chemotherapeutika auf Replikation und Stadiendifferenzierung von Toxoplasma gondii.*

Pszenny, V., Ehrenman, K., Romano, J. D., Kennard, A., Schultz, A., Roos, D. S., ... & Coppens, I. (2016). A lipolytic lecithin: cholesterol acyltransferase secreted by *Toxoplasma* facilitates parasite replication and egress. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), 3725-3746.

Pürzel, J., Schmitt, R., Viertelboeck, B. C., & Göbel, T. W. (2009). Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc α R1 interaction. *The Journal of Immunology*, 183(7), 4554-4559.

Radke, J. R., White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94, 237-247.

Redlich, A., Muller, W. A. (1998). Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res* 84: 700-6.

Reichmann, G., Długońska, H., & Fischer, H. G. (2002). Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. *Molecular and biochemical parasitology*, 119(1), 43-54.

Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*, 25(2), 264-296.

Robert-Koch-Institut,

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasrose.html#doc2390224bodyText19

Rome, M. E., Beck, J. R., Turetzky, J. M., Webster, P., & Bradley, P. J. (2008). Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, 76(11), 4865-4875.

Rommereim, L. M., Bellini, V., Fox, B. A., Pètre, G., Rak, C., Touquet, B., ... & Bzik, D. J. (2016). Phenotypes Associated with Knockouts of Eight Dense Granule Gene Loci (GRA2-9) in Virulent *Toxoplasma gondii*. *PloS one*, 11(7), e0159306.

Roizen N, Kasza K, Karrison T, Mets M, Noble AG, Boyer K, Swisher C, Meier P, Remington J, Jalbrzikowski J, McLeod R, Kipp M, Rabiah P, Chamot D, Estes R, Cezar S, Mack D, Pfiffner L, Stein M, Danis B, Patel D, Hopkins J, Holfels E, Stein L, Withers S, Cameron A, Perkins J, Heydemann P. (2006). Impact of visual impairment on measures of cognitive function for children with congenital toxoplasmosis: implications for compensatory intervention strategies. *Pediatrics* 118, 2: e379-90

Saadatnia, G., Mohamed, Z., Ghaffarifar, F., Osman, E., Moghadam, Z. K., & Noordin, R. (2012). Toxoplasma gondii excretory secretory antigenic proteins of diagnostic potential. *Apmis*, 120(1), 47-55.

Sadeghiani, G., Zare, M., Babaie, J., Shokrgozar, M. A., Azadmanesh, K., Fard-Esfahani, P., Golkar, M. (2009). Heterologous production of dense granule GRA7 antigen of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40: 692-700.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., & Higuchi, R. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487.

Sayles, P. C., Gibson, G. W., & Johnson, L. L. (2000). B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, 68(3), 1026-1033.

Schulzig, H.S. (2004) Untersuchungen zur epidemiologischen Bedeutung des Schweines bei der Verbreitung der humanen Toxoplasmose , Inaugural-Dissertation durch die Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Schwab, J. C., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), 509-513.

Sever, J. L., Ellenberg, J. H., Ley, A. C., Madden, D. L., Fuccillo, D. A., Tzan, N. R., Edmonds, D. M. (1988). Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23,000 pregnancies. *Pediatrics*. 82, 181-192.

Sheffield, H. G., Melton, M. L. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 54, 209-226.

Sibley, L. D., LeBlanc, A. J., Pfefferkorn, E. R., Boothroyd, J. C. (1992). Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics.* 132, 1003-1015.

Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F., & Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science*, 108(4), 1669-1677.

Sinai, A. P., Webster, P., & Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *Journal of cell science*, 110(17), 2117-2128.

Sinai, A. P., & Joiner, K. A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of cell biology*, 154(1), 95-108.

Solerte, S. B., Precerutti, S., Gazzaruso, C., Locatelli, E., Zamboni, M., Schifino, N., ... & Fioravanti, M. (2005). Defect of a subpopulation of natural killer immune cells in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: normalizing effect of dehydroepiandrosterone sulfate. *European journal of Endocrinology*, 152(5), 703-712.

Spekker, K. H. (2008). *Interaktions-und Sekretionsverhalten des "Dichte-Granula" Proteins GRA9 von Toxoplasma gondii* (Doctoral dissertation, Düsseldorf, Univ., Diss., 2008).

Stepick-Biek, P., Thulliez, P., Araujo, F. G., & Remington, J. S. (1990). 19A Antibodies for Diagnosis of Acute Congenital and Acquired Toxoplasmosis. *Journal of Infectious Diseases*, 162(1), 270-273.

Su, C., Shwab, E. K., Zhou, P., Zhu, X. Q., & Dubey, J. P. (2010). Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 137(01), 1-11.

Subauste, C. S., Remington, J. S. (1991). Role of gamma interferon in *Toxoplasma gondii* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 58-67. Review.

Takahashi, E. E., & Rossi, C. L. (1994). Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* splgA antibodies in acute toxoplasmosis. *Journal of clinical pathology*, 47(12), 1101-1104.

Takahashi, E. E., & Rossi, C. L. (1997). IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39(6), 327-332.

Tenter, A. M., & Johnson, A. M. (1991). Recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by human sera in an ELISA. *Parasitology research*, 77(3), 197-203.

Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brezin AP, Thulliez P, Wallon M, King L, Goulet V (2010). Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Eurosurveillance* 15(25)

Wan, K. L., Carruthers, V. B., Sibley, L. D., & Ajioka, J. W. (1997). Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Molecular and biochemical parasitology*, 84(2), 203-214.

Weiss, L. M., & Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 5, D391.

Wilking, H., Thamm, M., Stark, K., Aebischer, T., & Seeber, F. (2016). Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Scientific reports*, 6.

Wong, S. Y., Remington, J. S. (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 7, 299-316.

Wong, S. Y., Hajdu, M. P., Ramirez, R., Thulliez, P., McLeod, R., & Remington, J. S. (1993). Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis. *Journal of clinical microbiology*, 31(11), 2952-2959.

Wu, K., Chen, X. G., Li, H., Yan, H., Yang, P. L., Lun, Z. R., & Zhu, X. Q. (2009). Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 64(3), 261-266.

Yap, G. S., & Sher, A. (1999). Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ -and tumor necrosis factor (TNF)- α -dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *Journal of Experimental Medicine*, 189(7), 1083-1092.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vermehrungszyklus von <i>T. gondii</i>	S.3
Abbildung 2	Struktur der Tachyzoiten und Bradyzoiten.....	S. 13
Abbildung 3	<i>Toxoplasma gondii</i> Tachyzoiten und Bradyzoiten.....	S. 15
Abbildung 4	Lokalisation der GRA-Proteine in der Parasitophoren Vakuole.....	S. 21
Abbildung 5	Schematische Darstellung der Nukleinsäuresequenz der GRA-Proteine mit der jeweiligen vom Primer flankierten Sequenz.....	S. 55
Abbildung 6	Amplifikation der cDNA-Konstruktemittels Agarose-Gelelektrophorese.....	S. 55
Abbildung 7	Restriktionsverdau des pET32a(+)-GRA2-His-Konstrukts mittels des „fast digest“ Restriktionsenzym <i>PVUI</i>	S. 57
Abbildung 8	Darstellung der denaturierenden Proteinaufreinigung für die Proteine rGRA1-His ₆ , rGRA2-His ₆ , rGRA7-His ₆ , rMIC5-His ₆	S. 59-60
Abbildung 9	Nachweis der Proteine rGRA1- His ₆ , rGRA2- His ₆ , rGRA6- His ₆ , rGRA7- His ₆ , rGRA9- His ₆ und rMIC5- His ₆ nach denaturierter Proteinaufreinigung mittels anti-His ₆ -AK.....	S. 61
Abbildung 10	Spezifischer Nachweis der Proteine GRA1- His ₆ , GRA2- His ₆ , GRA9- His ₆ mittels anti-GRA1-, anti-GRA2- und anti-GRA9-Antikörper.....	S.62
Abbildung 11	Detektion der IgG-Ak gegen die rekombinanten His ₆ -Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 sowie rMIC5 unter Verwendung eines <i>T. gondii</i> -positiven Patienten-Serums sowie eines <i>T. gondii</i> -negativen Patienten-Serums.....	S. 64
Abbildung 12	Detektion von IgG-Ak unter Nutzung der rekombinanten His ₆ -Fusionsproteine im Fall einer reaktivierten, chronischen Toxoplasmose.....	S.66
Abbildung 13	Detektion von IgG-Ak gegen rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 sowie rMIC5 in mütterlichem und kindlichem Serum.....	S.67
Abbildung 14	Detektion der spezifischen IgG-, IgM-, und IgA-Ak gegen die rekombinant hergestellten His ₆ -Fusionsproteine rGRA1, rGRA2, rGRA6, rGRA7, rGRA9 und MIC5.....	S. 71

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulargewichte der Proteingrößenstandards von SeeBlue Plus.....	S. 28
Tabelle 2: Bakterienstämme.....	S. 34
Tabelle 3: <i>Toxoplasma gondii</i> - Stämme.....	S. 35
Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.....	S. 49
Tabelle 5: Detektion der IgG-Ak gegen die rekombinant hergestellten Fusionsproteine für . verschiedene Serumgruppen unterteilt nach jeweiligem IFT-Titer.....	S. 69
Tabelle 6: Auswertung der Detektion der spezifischen IgM-Ak gegen die rekombinant hergestellten His ₆ -Fusionsproteine.....	S. 73
Tabelle 7: Auswertung der Detektion der spezifischen IgA-Ak gegen die rekombinant hergestellten His ₆ -Fusionsproteine.....	S. 74
Tabelle 8: spezifische IgG-Detektion gegen die in dieser Arbeit untersuchten Antigene im Vergleich mit publizierten Arbeiten.....	S. 79
Tabelle 9: spezifische IgM-Detektion gegen die in dieser Arbeit untersuchten Antigene im Vergleich mit anderen Arbeiten.....	S. 87
Tabelle 10: spezifische IgA-Detektion gegen die in dieser Arbeit untersuchten Antigene im Vergleich mit anderen Arbeiten.....	S. 90

9. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Walter Däubener, für die Überlassung des Themas sowie seine zahlreichen hilfreichen Ratschläge und wertvollen Korrekturen. Ich danke ihm besonders für seine Unterstützung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen über all die Jahre.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Katrin Spekker-Bosker und bei Frau Ince für die außerordentlich gute Betreuung bedanken. Mit ihrem geduldigen Zuhören und praktischer Hilfe im Labor standen mir beide immer zur Seite.

Bei Frau Dr. Spekker-Bosker bedanke ich mich außerdem für ihre anregende und konstruktive Kritik sowie hilfreichen Korrekturen während der Anfertigung meiner Arbeit.

Herrn Universitäts-Professor Dr. Klaus Pfeffer danke ich für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit in seinem Institut.

Ich danke ebenfalls den Mitarbeiterinnen und -mitarbeitern der Serologischen Abteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene für die enge Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen lieben Eltern Gertrud und Michael Brunder, die mit viel Rücksicht den Glauben an einen Abschluss dieser Dissertation nie verloren haben.

Ebenfalls danke ich Dr. Carl Johannes Minkus für das liebevolle Aushalten des ein oder anderen Nervenzusammenbruchs sowie die ermutigende Unterstützung während der Korrekturphase.

Ein weiteres Lob gilt all meinen Freunden, die mich entweder durch Formatierungshilfen oder aber durch Ihre bloße Existenz beim Abschluss dieser Doktorarbeit unterstützt haben.