

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Martina G. Ding

aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

**Funktionelle Charakterisierung antioxidativer Enzyme
aus *Toxoplasma gondii***

Gutachter:

Prof. Dr. Christine E. Clayton

Prof. Dr. R. Luise Krauth-Siegel

1. EINLEITUNG	1
1.1 <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	1
1.1.1 <i>Die Bedeutung von Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.2 <i>Pathogenese</i>	1
1.1.3 <i>Lebenszyklus von Toxoplasma gondii</i>	2
1.1.4 <i>Toxoplasma Genom</i>	4
1.1.5 <i>Organellen und Entstehung der Parasitophoren Vakuole</i>	4
1.1.6 <i>Asexuelle Vermehrung und Egression aus der Parasitophoren Vakuole</i>	6
1.1.7 <i>Toxoplasma Zytoskelett und Fortbewegung</i>	6
1.1.8 <i>Toxoplasma gondii im Labor</i>	7
1.2 <i>MICROBODIES</i>	8
1.2.1 <i>Bedeutung der microbodies</i>	10
1.2.2 <i>Biogenese der microbodies</i>	10
1.2.3 <i>Import von Matrix- und Membranproteinen</i>	11
1.3 <i>OXIDATIVER STRESS, REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS), ANTIOXIDATIVE ABWEHR</i>	12
1.3.1 <i>Katalasen</i>	13
1.3.1.1 <i>Struktur von typischen Katalasen</i>	14
1.3.1.2 <i>Quartärstruktur typischer Katalasen</i>	17
1.3.1.3 <i>Der Substratkanal und die Reaktivität von Katalasen</i>	18
1.3.1.4 <i>Die Rolle von NADPH in typischen Katalasen</i>	19
1.3.1.5 <i>Lokalisation typischer Katalasen</i>	19
1.3.2 <i>Peroxidoxine</i>	19
1.4 <i>ZIELSETZUNG</i>	22
2. MATERIAL	23
2.1 <i>LABORAUSSTATTUNG</i>	23
2.2 <i>CHEMIKALIEN</i>	23
2.3 <i>VERBRAUCHSMATERIALIEN</i>	24
2.4 <i>VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER</i>	24
2.5 <i>VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER</i>	25
2.5.1 <i>Immunfluoreszenzanalyse</i>	25
2.5.2 <i>Western Blot-Analyse</i>	26
2.6 <i>HERSTELLUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER</i>	26
2.7 <i>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN</i>	26
2.7.1 <i>Bakterien-Stämme</i>	26
2.7.2 <i>Bakterienkultur</i>	26

2.7.3. Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien.....	27
2.7.4. Transformation kompetenter Bakterien.....	27
2.8 ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON DNA.....	27
2.8.1. Lösungen zur Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	27
2.8.2. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	28
2.8.3. Aufreinigung chromosomaler DNA aus <i>T. gondii</i>	29
2.8.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	29
2.9 MODIFIKATION UND REKOMBINATION VON DNA.....	29
2.9.1 Enzyme.....	29
2.9.2 Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.9.3 Materialien für die RT-PCR.....	30
2.9.4 Reinigung von PCR-Produkten.....	30
2.9.5 Klonierung (von PCR-Produkten).....	30
2.10 MARKIERUNG VON DNA.....	31
2.10.1 Markierung von DNA mit Digoxigenin.....	31
2.11 ANALYSE VON DNA.....	31
2.11.1 DNA-Größenmarker.....	31
2.11.2 Gelelektrophorese.....	31
2.11.3 Southern Blot-Analyse.....	31
2.12 NUKLEINSÄUREN.....	32
2.12.1 Vektoren und Cosmide.....	32
2.12.2 Oligonukleotide.....	33
2.13 PRÄPARATION UND ANALYSE VON RNA.....	36
2.13.1 RNA-Größenmarker.....	36
2.13.2 Präparation von RNA aus <i>T. gondii</i>	36
2.13.3 Northern Blot-Analyse.....	36
2.14 PROTEIN-ANALYSE.....	37
2.14.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	37
2.14.2 TCA-Präzipitation.....	37
2.14.3 Herstellung von Zell-Lysaten aus <i>T. gondii</i> mittels RIPA-Lysat.....	37
2.14.4 Herstellung von Zell-Lysaten unter Verwendung von Triton X-100®PC.....	37
2.14.5 Fraktionierung von Toxoplasmen mit Digitonin.....	38
2.14.6 Aufbrechen von Toxoplasmen mit Glaskugeln (glass beads).....	38
2.14.7 Protein-Größenmarker.....	38
2.14.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	39
2.14.9 Anodisches diskontinuierliches Polyacrylamidgelelektrophoresesystem.....	39
2.14.10 Western Blot-Analyse.....	40

2.14.11 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	40
2.14.12 Aufreinigung von Seren	40
2.15 ENZYM-ASSAYS.....	41
2.15.1 Enzymatische Messung der Katalase-Aktivität	41
2.15.2 Enzymatische Messung der Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivität	41
2.16 BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT PEROXID	41
2.16.1 Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid	41
2.17 UNTERSUCHUNG DER KATALASE-DEFIZIENTEN TOXOPLASMEN IM MÄUSEMODELL.....	42
2.17.1 <i>in vivo</i> Virulenztest.....	42
2.18 ZELLKULTURMATERIAL.....	42
2.18.1 Zellkulturmedium für die Kultivierung von <i>T.gondii</i> und Wirtszellen.....	42
2.18.2 Wirtszellen	42
2.18.3 Passagieren der Wirtszellen.....	42
2.18.4 Einfrieren und Auftauen von Parasiten.....	42
2.18.5 Lösungen für die Transfektion und Selektion von <i>T. gondii</i>	43
3. METHODEN	44
3.1 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	44
3.1.1 Bakterienkultur.....	44
3.1.2 Lagerung von Bakterien.....	44
3.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	44
3.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	45
3.2 ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON DNA.....	45
3.2.1 Phenol-/Chloroform-Extraktion.....	45
3.2.2 Chloroformextraktion.....	45
3.2.3 Alkoholfällung von Nukleinsäuren	45
3.2.4 Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration von DNA (OD-Messung).....	46
3.2.5 Methode zur schnellen Aufreinigung von Plasmid-DNA (Mini-Präparation).....	46
3.2.6 Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation).....	47
3.2.7 Aufreinigung chromosomaler DNA aus <i>T. gondii</i>	47
3.3 MODIFIKATION UND REKOMBINATION VON DNA	48
3.3.1 Restriktion von DNA	48
3.3.2 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase (CIP).....	48
3.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	48
3.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	48
3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
3.3.6 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	50

3.4 MARKIERUNG VON DNA.....	51
3.4.1 Markierung mit Digoxigenin.....	51
3.5 ANALYSE VON DNA.....	52
3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	52
3.5.2 Sequenzierung von DNA.....	52
3.5.3 Southern Blot.....	52
3.5.4 Southern Blot-Analyse.....	53
3.6 PRÄPARATION UND ANALYSE VON RNA.....	53
3.6.1 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>T. gondii</i>	53
3.6.2 Auftrennung von RNA im denaturierenden Formaldehydgel.....	54
3.6.3 Northern Blot.....	54
3.6.4 Northern Blot-Analyse.....	54
3.7 PROTEIN-ANALYSE.....	55
3.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	55
3.7.2 TCA-Präzipitation.....	55
3.7.3 Herstellung eines Gesamtzellextraktes für die Proteinanalyse.....	55
3.7.4 Herstellung von Zell-Lysaten aus <i>T. gondii</i> mittels RIPA-Lysat.....	55
3.7.5 Herstellung von Zell-Lysaten unter Verwendung von Triton X-100® PC.....	56
3.7.6 Fraktionierung von Toxoplasmen mit Digitonin.....	56
3.7.7 Fraktionierung von Zellen durch Sonifizierung (für die native PAGE).....	57
3.7.8 Aufbrechen von Zellen durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen.....	57
3.7.9 Aufbrechen von Toxoplasmen mit Glaskugeln (glass beads).....	57
3.7.10 Fraktionierung von Zellhomogenaten mittels anschließendem Ultrazentrifugationsschritt.....	58
3.7.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	58
3.7.12 Anodisches diskontinuierliches Polyacrylamidgelelektrophoresesystem.....	59
3.7.13 Western Blot.....	59
3.7.14 Western Blot-Analyse.....	60
3.7.15 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA).....	60
3.7.16 Direkte Immunfluoreszenzanalyse mit GFP.....	61
3.7.17 Herstellung von Antikörpern.....	61
3.7.18 Vorbereitung der Dialyseschläuche.....	62
3.7.19 Aufreinigung der Antikörper mittels Affi-Gel® 15 Gel.....	62
3.8 ENZYM-ASSAYS.....	63
3.8.1 Enzymatische Messung der Katalase-Aktivität.....	63
3.8.2 Enzymatische Messung der Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivität.....	64
3.8.3 Ellman-Test zur Bestimmung freier Thiole.....	65

3.9 BEHANDLUNG DER ZELLEN MIT PEROXID	65
3.9.1 Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid	65
3.10 UNTERSUCHUNG DER KATALASE-DEFIZIENTEN TOXOPLASMEN IM MÄUSEMODELL.....	66
3.10.1 <i>in vivo</i> Virulenztest.....	66
3.11 ZELLKULTURMETHODEN	67
3.11.1 Bestimmung der Zellzahl	67
3.11.2 Kultivierung von <i>T. gondii</i> und Wirtszellen	68
3.11.3 Passagieren der Wirtszellen.....	68
3.11.4 Einfrieren und Auftauen von Parasiten.....	68
3.11.5 Transiente Transfektion von <i>T. gondii</i>	69
3.11.6 Stabile Transfektion und Selektion.....	69
3.11.7 Stabile Transfektion zur Herstellung von knock out Mutanten	70
3.12 SEQUENZANALYSE.....	70
4. ERGEBNISSE	71
4.1 IDENTIFIZIERUNG EINER PUTATIVEN KATALASE IM EST-SEQUENZIERPROJEKT	71
4.1.1 Ermittlung der Gen-Sequenz der <i>T. gondii</i> Katalase mittels primer walking und Charakterisierung des Gen-Lokus.....	72
4.1.2 Alignment der <i>T. gondii</i> Katalase.....	76
4.1.3 Northern Blot auf Tachyzoiten-RNA.....	78
4.1.4 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die <i>T. gondii</i> Katalase.....	78
4.1.4.1 Charakterisierung der polyklonalen Antiseren im Western Blot	79
4.1.4.2 Charakterisierung der polyklonalen Antiseren in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse (IFA)	80
4.1.5 Fraktionierung von <i>T. gondii</i> RH Tachyzoiten zur subzellulären Lokalisation der <i>T. gondii</i> Katalase.....	82
4.1.5.1 Fraktionierung von Toxoplasmen mit Digitonin	82
4.1.5.2 Mechanischer Aufbruch der Toxoplasmen mit <i>glass beads</i> und anschließende Fraktionierung .	84
4.1.6 Aufreinigung der Anti- <i>T. gondii</i> -Katalase Seren mittels der dazugehörigen Peptide	85
4.1.6.1 Analyse der gereinigten Anti- <i>T. gondii</i> -Katalase Seren im Western Blot.....	86
4.1.6.2 Analyse der gereinigten Anti- <i>T. gondii</i> -Katalase Seren in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse	87
4.1.7 Native PAGE (Anodisches diskontinuierliches Polyacrylamidgelelektrophoresesystem) ...	88
4.1.8 Doppelimmunfluoreszenzanalyse mit Serum #96 und monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen Markerproteine von sekretorischen <i>T. gondii</i> Organellen.....	90
4.1.9 Verwendung des Serums #96 in der IFA mit dem Prugniaud-Stamm.....	91
4.1.10 Lokalisation von GFP-PTS1 Fusionsproteinen in <i>T. gondii</i>	91
4.1.11 Bedeutung der Katalase in <i>T. gondii</i>	94

4.1.11.1 Herstellung der zum Ausschalten des Katalase-Gens verwendeten Konstrukte	94
4.1.11.2 <i>Western Blot</i> -Analyse der Katalase <i>knock out</i> Klone	96
4.1.11.3 Immunfluoreszenzanalyse des <i>Katalase knock out</i> Klons.....	97
4.1.12 <i>Etablierung diverser Zelllinien zur Untersuchung der Funktion der T. gondii Katalase</i> ..99	
4.1.12.1 Herstellung des <i>Katalase</i> cDNA Konstruktes	99
4.1.12.2 <i>Western Blot</i> mit diversen <i>T. gondii</i> Klonen, die Katalase (nicht) exprimieren	100
4.1.12.3 Charakterisierung der Klone RHKatov und RHKatomp in der Immunfluoreszenzanalyse. 101	
4.1.13 <i>Enzym-assays mit Zellextrakten verschiedener T. gondii Klone</i>	102
4.1.14 <i>Behandlung verschiedener Toxoplasma gondii Zelllinien mit Wasserstoffperoxid</i>	105
4.1.15 <i>Untersuchung der Katalase-defizienten Toxoplasmen im Mäusemodell</i>	107
4.2 IDENTIFIZIERUNG ZWEIER PUTATIVER <i>PEROXIDOXINE</i> IN <i>T. GONDII</i>	112
4.2.1 <i>Identifizierung zweier T. gondii Peroxidoxine</i>	113
4.2.1.1 <i>Alignment des Toxoplasma gondii 2-Cys Peroxidoxins</i>	113
4.2.1.2 <i>Ermittlung der Sequenz eines T. gondii 1-Cys Peroxidoxins</i>	114
4.2.1.3 <i>Alignment des Toxoplasma gondii 1-Cys Peroxidoxins</i>	115
4.2.2 <i>Klonierung zweier T. gondii Peroxidoxine in einen T. gondii Expressionsvektor</i>	116
4.2.2.1 <i>Herstellung von Zelllinien, die rekombinantes Pxn1 bzw. Pxn2 exprimieren</i>	117
4.2.2.2 <i>Western Blot</i> -Analyse der rekombinanten Peroxidoxine	117
4.2.2.3 <i>Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das T. gondii Pxn2 und Western Blot</i> -Analyse der Seren	119
4.2.2.4 (Doppel-) <i>Immunfluoreszenzanalysen auf die PxnTy exprimierenden Zelllinien und den Wildtyp mit verschiedenen Seren und Antikörpern</i>	120
5. DISKUSSION	123
5.1 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG EINER KATALASE AUS TOXOPLASMA GONDII	124
5.1.1 <i>Ermittlung der T. gondii Katalase-Sequenz</i>	124
5.1.2 <i>Lokalisation der Toxoplasma gondii Katalase in der Zelle</i>	125
5.1.3 <i>Ausschalten des T. gondii Katalase-Gens</i>	130
5.1.4 <i>Enzymatische Charakterisierung der T. gondii Katalase</i>	132
5.1.5 <i>Enzymatische Messung der Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivität</i>	134
5.1.6 <i>Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid</i>	135
5.1.7 <i>Untersuchung der Katalase-defizienten Toxoplasmen im Mäusemodell</i>	138
5.2 PEROXIDOXINE	140
6. ZUSAMMENFASSUNG	144
7. ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN	145
8. LITERATUR	148

1. Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii*

1.1.1 Die Bedeutung von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit und wurde erstmals 1908 von Nicolle und Manceaux beschrieben, die an dem Nordafrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gondi* arbeiteten und hieraus den Parasiten isolierten (Nicolle und Manceaux, 1908). Der Name Toxoplasma rührt von der griechischen Bezeichnung für Bogen, toxon, her, was sich auf die Form des Parasiten bezieht. Der Erreger gehört zu den Einzellern des Stammes Apicomplexa, der etwa 5000 Arten erfaßt, und in die Ordnung der Coccidien (Levine, 1987). Die Bezeichnung „Apicomplexa“ bezieht sich auf den apikalen und typisch strukturierten Komplex, den alle vegetativen Stadien dieses Stammes aufweisen. Dieser Komplex beinhaltet sowohl Organellen als auch komplexe zytoskeletale Elemente (Dubey et al., 1998) und wird als Penetrationsapparat für das Eindringen in die Wirtszelle gedeutet.

Andere Vertreter der Gruppe Apicomplexa sind z. B. *Plasmodium*, der Malaria-Erreger, an dem 300-500 Millionen Menschen erkrankt sind, des weiteren *Eimeria*, der Verursacher der Hühner-Coccidiose sowie *Cryptosporidium* und *Pneumocystis*.

Von der gesamten Weltbevölkerung sind 10-25 % mit *T. gondii* infiziert (Sibley und Howe, 1996), wobei es starke regionale Unterschiede gibt, abhängig vom Alter, Ort und den Ernährungsgewohnheiten. In Europa und Nordamerika machen schätzungsweise 40 –50 % der Bevölkerung eine Infektion durch (Storch und Welsch, 1994). Toxoplasmen sind in der Lage, nahezu alle kernhaltigen Säuger- und Vogelzellen zu infizieren und sich darin zu replizieren (Dubey, 1998; Wong und Remington, 1993). Die Endwirte von *Toxoplasma* sind ausschließlich Katzen bzw. Katzenartige (Wallace et al., 1972). Die Infektion mit Toxoplasmen erfolgt durch den Verzehr von zystenhaltigem, rohem Fleisch bzw. durch Kontakt mit Katzenkot, der Oozysten enthält, die mehrere Jahre infektiös bleiben.

1.1.2 Pathogenese

In der Regel ist der Verlauf einer Infektion symptomlos oder ähnelt einer leichten Grippe mit schmerzloser Lymphadenopathie, Müdigkeit und gelegentlich Fieber; dieses Krankheits-

gefühl kann über mehrere Wochen andauern, eine medikamentöse Behandlung ist nicht erforderlich. Nach der akuten Phase bildet der Parasit Zysten im Gewebe, bevorzugt in Muskulatur und Gehirn, und die Krankheit geht in die chronische Phase über. Bei nicht-immunkompetenten Personen, wie z. B. AIDS-Kranken oder Organtransplantat-Empfängern, kann es zu einer Primoinfektion bzw. einer Reaktivierung der chronischen Infektion kommen, was in Läsionen im Gehirn und Toxoplasmen-Enzephalitis resultiert (Wong und Remington, 1993), die unbehandelt zum Tod führt (Luft und Remington, 1992).

Die derzeitige Behandlung besteht aus Sulfonamid und Pyrimethamin (Tenant-Flowers et al., 1991) und wirkt effektiv gegen die schnell replizierenden Parasiten des akuten Stadiums, die sogenannten Tachyzoiten. Auch ist die Gabe von Clindamycin und Folsäure möglich. Die Behandlung tötet jedoch nicht die Parasiten der chronischen Phase, die sogenannten Bradyzoiten, so dass bei immunsupprimierten Personen eine dauerhafte Medikamenteneinnahme nötig ist. Bei einer Erstinfektion von Schwangeren führen 25 % der mütterlichen Infektionen, die im ersten Trimester der Schwangerschaft erworben wurden, und etwa 65 % der mütterlichen Infektionen, die im letzten Trimester erworben wurden, zu einer kongenitalen Infektion (Desmots und Couvreur, 1974). Meist gilt, je früher während der Schwangerschaft die Erstinfektion mit dem Parasiten auftrat, desto gravierender sind die Folgen (Desmots und Couvreur, 1974); die Auswirkungen können sich stark unterscheiden: Totgeburten, Aborte, Hydrocephalus, Retinochoroiditis bis hin zu milden Symptomen oder Symptomlosigkeit. Teilweise fallen die Schäden erst Jahre später auf (Sever et al., 1988).

1.1.3 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Der Lebenszyklus wird unterteilt in den Teil, der in der Katze, dem Endwirt, stattfindet, und den nichtfelinen Teil in diversen Zwischenwirten, eine Unterteilung, die mit der sexuellen und asexuellen Fortpflanzung korreliert. Innerhalb der Katze kann jedoch auch die asexuelle Fortpflanzung stattfinden. Bei der asexuellen Fortpflanzung werden hauptsächlich zwei Formen unterschieden: Zum einen die schnell replizierenden Tachyzoiten (griech tachos = schnell), die die akute Phase der Infektion markieren und eine Größe von ca. 5 μm und eine Breite von ca. 2 μm haben. Sie teilen sich alle 6 bis 8 Stunden (*in vitro*) und verlassen die Wirtszelle, nachdem sich darin etwa 128 Parasiten angehäuft haben (Radke und White, 1998). Zum anderen können sich die Tachyzoiten in infizierten Tieren in die langsam wachsenden, sogenannten Bradyzoiten (griech brady = langsam) umwandeln, die Gewebe (Pseudo-) Zysten bilden, welche etwa 7 bis 10 Tage nach der Infektion auftauchen. Sie besitzen eine Größe von

ca. 150 μm . Diese Zysten werden bevorzugt in der Muskulatur und im Zentralen Nervensystem (ZNS) gebildet, wo sie ein Leben lang verbleiben. Die Bildung von Zysten markiert die chronische Phase des asexuellen Zyklus. Werden diese Zysten durch Verzehr aufgenommen, so werden die Bradyzoiten nach Aufbruch der Zysten frei und infizieren das Darmepithel, wo sie sich dann wieder zu Tachyzoiten differenzieren, die sich im ganzen Körper ausbreiten. Dies erfolgt durch die Infektion von Makrophagen, die den Parasiten dann im ganzen Körper verteilen. Hiermit ist der asexuelle Zyklus komplett.

Gelegentlich findet auch innerhalb des Wirtes eine Reaktivierung der Bradyzoiten statt, die sich wieder in Tachyzoiten differenzieren. Normalerweise verhindert dann das Immunsystem eine weitere Verbreitung des Parasiten im Körper.

Der sexuelle Zyklus läuft nur in Katzen ab und ist erst seit 1970 durch die Entdeckung der sexuellen Stadien im Dünndarm von Katzen bekannt (Dubey et al., 1970; Dubey et al., 1970; Dubey et al., 1970; Frenkel, 1970; Frenkel et al., 1970). Frisst beispielsweise eine Katze zystenhaltiges Fleisch, so wird die Zyste durch proteolytische Enzyme aufgelöst, und die freigesetzten Parasiten infizieren Epithelzellen des Dünndarms. Nach mehrfacher asexueller Vermehrung werden Mikro- und Makrogameten gebildet, deren Verschmelzung zu einer diploiden, ca. $12 \times 10 \mu\text{m}$ großen Oozyste führt, die mit dem Kot ausgeschieden wird. Erst dann findet die Reifung der Oozyste statt, die zur Infektiösität führt. Nach der oralen Aufnahme der Oozyste durch einen Wirt werden die darin enthaltenen, durch Meiose entstandenen 8 Sporozoiten im Darmepithel frei und differenzieren sich zu Tachyzoiten. Alle Stadien außer der Oozyste sind haploid.

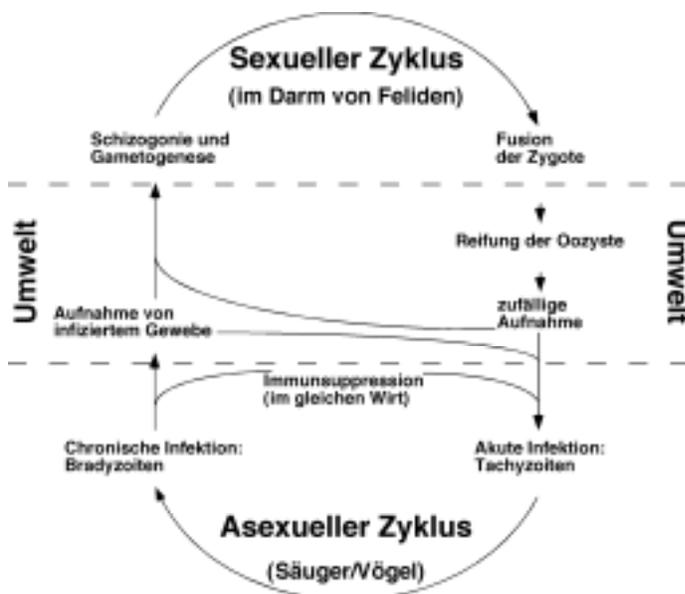


Abb. 1.1 Lebenszyklus von *T. gondii*. Die obere Hälfte bezieht sich auf den sexuellen Zyklus, der nur in Feliden stattfinden kann, die untere Hälfte auf den asexuellen Zyklus (Nach Black und Boothroyd, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sept. 2000, S. 607-23, *Lytic Cycle of Toxoplasma gondii*). Die sexuelle und die asexuelle Komponente dieses Zyklus sind voneinander unabhängig, d.h. es kann auch nur der asexuelle Zyklus (unendlich) stattfinden.

Auch in der Katze findet der asexuelle Zyklus statt.

1.1.4 *Toxoplasma* Genom

Das haploide nukleäre Genom von *T. gondii* besteht aus 8×10^7 bp (Cornelissen et al., 1984), der Parasit besitzt 11 Chromosomen deren Größe zwischen 2 Mb und größer 10 Mb liegt (Sibley und Boothroyd, 1992; Sibley et al., 1992). In den Mitochondrien befindet sich ein Multikopien-Element von 6 bis 7 kb, das für Proteine der Atmungskette und stark fragmentierte rRNAs kodiert (Vaidya et al., 1989). Darüber hinaus besitzen Parasiten des Stammes Apicomplexa ein weiteres DNA-enthaltendes, chloroplastenartiges Organell, den sogenannten Apicoplasten. Er enthält acht Kopien eines 35 kb Elementes, das Ähnlichkeit mit Chloroplastengenomen zeigt. Das 35 kb Element enthält Gene, die typischerweise in Chloroplasten vorkommen (Kohler et al., 1997). Man nimmt an, dass das Organell durch sekundäre Endosymbiose einer Grünalge entstanden ist (Fichera und Roos, 1997), was auch die vier Membranen erklärt, von denen der Apicoplast umgeben ist.

1.1.5 Organellen und Entstehung der Parasitophoren Vakuole

Erwähnt wurden bereits (s.1.1.4) Mitochondrium und Apicoplast. Der Kern befindet sich etwa mittig in der Zelle, und die Kernhülle geht in das ER über. Anterior davon ist der Golgi-Apparat, und die Komponenten des sekretorischen Weges scheinen denen anderer Eukaryonten zu entsprechen. Das TGN (Trans Golgi Netzwerk) scheint als Sortierort für Proteine zu fungieren, die sekretiert werden oder die zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurücktransportiert werden müssen (Ngo et al., 2000). Darüber hinaus besitzen apicomplexe Parasiten spezielle, regulierte sekretorische Organellen, die vermutlich Teil des klassischen sekretorischen Weges sind. Hierzu zählen die apikal lokalisierten, zigarrenförmigen Mikronemen und die keulenförmigen Rhoptrien, außerdem die über die ganze Zelle verteilten kugeligen Dichten Granula. Jedes dieser Organellen besitzt Proteine, deren Funktion mit dem zeitlichen Entladen der Organellen während der Invasion zusammenhängt. Eventuell ist eine Exozytose von Mikronemenproteinen und Rhoptrienproteinen auch für die Egressions des Parasiten aus seiner Wirtszelle erforderlich.

Für die Invasion von *T. gondii* ist nach einer Kontaktaufnahme mit der Wirtszelle die Ausrichtung mit dem apikalen Ende nötig. Es erfolgt die Ausschüttung des Mikronemeninhalts, vermutlich durch Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration in der frühen Phase des Anheftungs- und Invasionsprozesses. Während die Invasion fort dauert und die Wirtszellplasmamembran eingestülpt wird, entlädt sich der Inhalt der Rhoptrien und endet nach dem vollständigen Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle (Carruthers und

Sibley, 1997). Nach erfolgter Invasion wird der Inhalt der Dichten Granula nach Fusion mit der Plasmamembran des Parasiten ausgeschüttet. Dies geschieht hauptsächlich am apikalen Ende (Dubremetz et al., 1993; Leriche und Dubremetz, 1990) des Parasiten.

Die durch den beschriebenen Invasionsprozeß entstehende Parasitophore Vakuole (Lingelbach und Joiner, 1998) besitzt die ungewöhnliche Eigenschaft, nicht zu azidifizieren oder mit zytoplasmatischen Vesikeln zu fusionieren, nicht einmal mit jenen, die zeitgleich während des Eindringens des Parasiten in die Wirtszelle aufgenommen wurden (Jones et al., 1972; Sibley et al., 1985). Die Beobachtung, dass eine neuentstandene Parasitophore Vakuole glatt ist und fast vollständig frei von intramembranösen Partikeln (Dubremetz et al., 1993), deutet darauf hin, dass die für eine vesikuläre Fusion nötigen Protonenpumpen und Oberflächenproteine aus dieser Membran ausgeschlossen beziehungsweise sehr schnell eliminiert werden.

Die Parasitophore Vakuole ist auch verantwortlich für die sofortige Rekrutierung der Wirtszell- Mitochondrien und des Wirtszell-ER (Porchet-Hennere und Nicolas, 1983; Sinai et al., 1997), die eine enge Interaktion mit der Vakuolenmembran eingehen und 4 Stunden nach der Infektion fast 75 % derselben bedecken (Sinai et al., 1997). Da es Hinweise gibt, dass *T. gondii* nicht zur *de novo* Synthese von Fettsäuren in der Lage ist (Sinai et al., 1997), bietet diese Interaktion eventuell die Möglichkeit eines Lipidtransportes durch das tubulovesikuläre Netzwerk innerhalb der Vakuole hin zum Parasiten.

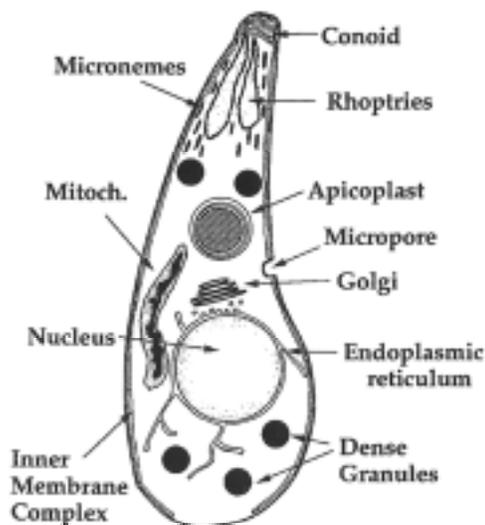


Abb. 1.2 *Toxoplasma* Organellen; gezeigt sind die Organellen des sich asexuell vermehrenden Tachyzoiten-Stadiums. Mitoch.: Das einzelne Mitochondrium. Sekretorische Organellen: Rhoptrien (*Rhoptries*), Mikronemen (*Micronemes*) und Dichte Granula (*Dense granules*). Eingezeichnet ist auch der unter 1.1.7 beschriebene Innere Membran Komplex (IMK).

Aus Black und Boothroyd, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sept. 2000, S. 607-23, *Lytic Cycle of Toxoplasma gondii*.

1.1.6 Asexuelle Vermehrung und Egression aus der Parasitophoren Vakuole

Toxoplasma besitzt eine besondere Form der asexuellen Vermehrung, die sogenannte Endodyogenie (van der Zypen und Piekarski, 1967; van der Zypen und Piekarski, 1968). Hierbei findet die Vermehrung nur innerhalb der Wirtszelle statt, wobei in einer Mutterzelle zwei Tochterzellen entstehen. Die zellulären Signale und die für diesen Prozess nötige Maschinerie sind weitgehend unbekannt. Die Kernhülle bleibt intakt, während der Nukleus, der Apicoplast und das Mitochondrium sich zwischen den beiden Tochterzellen teilen. Die von der Mutterzelle stammende Plasmamembran bildet auch wieder die Plasmamembran der beiden Tochterzellen. Vom anterioren Ende her bildet sich eine Teilungsfurche bis hin zum posterioren Ende der beiden Tochterzellen, wo die Parasiten jedoch nicht völlig getrennt werden, sondern über einen schmalen Bereich der ursprünglichen Mutterzelle verbunden bleiben, den sogenannten *residual body* (Black und Boothroyd, 2000). Diese Verbindung führt bei weiteren Replikationen zur Formierung von Parasiten-Rosetten innerhalb der Vakuole, wobei die freien anterioren Enden der Parasiten vom Zentrum wegzeigen.

Diese besondere Form der Vermehrung, bei der das Zytoskelett und das organelläre Netzwerk fast die ganze Zeit hindurch intakt bleiben, ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die Parasiten fast zu jedem Zeitpunkt während der intrazellulären Phase die Zelle verlassen und neue Wirtszellen befallen können (Endo et al., 1982). Der für die Egression verantwortliche Stimulus ist nicht bekannt, nur, dass Ca^{2+} eine wichtige Rolle bei der Aktivierung spielt (Endo et al., 1982; Schwab et al., 1994). Die Plasmamembran der Wirtszelle wird zerstört, was zur Zytolyse führt.

1.1.7 *Toxoplasma* Zytoskelett und Fortbewegung

Das Zytoskelett in *T. gondii* ist für die polarisierte Sekretion und für die besondere Fortbewegung, die gleitende Fortbewegung - *gliding motility* - die die Invasion ermöglicht, verantwortlich (Frixione et al., 1996; Nichols und Chiappino, 1987). An der anterioren Spitze befinden sich zwei präkonoidale Ringe, es folgt der Konoid, dessen Komponenten unbekannt sind und ein polarer Ring, der als Mikrotubuli-Organisierungszentrum fungiert. Von ihm gehen 22 Mikrotubuli aus, die spiralförmig etwa zwei Drittel des Parasitenkörpers hinunterziehen. In vielen dieser Strukturen wurde Aktin nachgewiesen (Nichols und Chiappino, 1987).

Die Alveolaten, zu denen *T. gondii* gehört, zeichnen sich durch den Inneren Membran Komplex (IMK) aus, der aus abgeflachten Membranvesikeln besteht, die direkt unter der Plasmamembran des Parasiten liegen (Ogino, 1966). Alle drei Membranen zusammen bilden

die sogenannte Pellicula. Sie verläuft von den präkonoidalen Ringen bis zum posterioren Ende der Zelle (Dubremetz und Torpier, 1978). Eine Unterbrechung findet sich im Bereich der Mikropore, bei der es sich vermutlich um eine aktive Endozytose-Region handelt, und Clathrin-artige Vesikel scheinen in diesem Bereich vorhanden zu sein (Nichols et al., 1994). Der Durchmesser der IMK Vesikel beträgt 20 bis 100 nm. Die einzelnen Vesikel sind miteinander „vernäht“. Die Funktion dieser Vesikel wurde noch nicht bestimmt, ihre enge Assoziation mit den Mikrotubuli lässt jedoch auf eine Rolle in der Zellmotilität bzw. Strukturgebung schließen. In Ermangelung von Zilien oder Flagellen zeigen apicomplexe Parasiten eine besondere Art der Fortbewegung, die als gleitende Fortbewegung bezeichnet wird. Man geht davon aus, dass Aktin/Myosin Motoren innerhalb des Parasiten und Transmembranproteine, die diese Motoren mit einem außerhalb der Zelle liegenden Liganden verbinden, dafür verantwortlich sind (Morrissette und Sibley, 2002). Diese Fortbewegung beinhaltet keine größeren Konformationsänderungen in der Zelle, der Prozeß ist energieabhängig und befördert die Zellen zwischen 1 bis 10 $\mu\text{m/s}$ (King, 1988). Die Invasion der Wirtszelle ist ein aktiver Prozeß (Ryning und Remington, 1978), der sich von der Endozytose unterscheidet und die gleitende Fortbewegung erfordert.

1.1.8 *Toxoplasma gondii* im Labor

Toxoplasma gondii kann aufgrund seiner guten Zugänglichkeit für genetische Analysen als ein Modellsystem für den intrazellulären Parasitismus betrachtet werden. Mit Hilfe von Standard Zellkultur-Techniken ist der Parasit leicht in Kultur zu halten. Durch das haploide Genom ist das Verändern beziehungsweise Eliminieren eines Gens stark vereinfacht, verglichen mit diploiden Organismen. Aufgrund der geringen Fähigkeit des Parasiten zu Migrieren ist es relativ leicht, durch limitierende Verdünnung einzelne Klone mittels Plaque-Isolierung zu erhalten (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1976). *T. gondii* ist das erste obligat intrazelluläre Protozoon das mit exogener DNA transformiert wurde (Donald und Roos, 1993; Soldati und Boothroyd, 1993). Dadurch wurden wiederum Möglichkeiten für die reverse Genetik geschaffen. Promotoren von höheren Eukaryonten und Viren sind in *T. gondii* nicht aktiv, so dass toxoplasmeneigene Promotoren benötigt werden. Eine Reihe von Markern wurde für die Selektion von Transformanten entwickelt: *Chloramphenicolacetyltransferase* (CAT) (Kim et al., 1993), *Dihydrofolat-Reduktase-Thymidilat-Synthase* (DHFRS) (Donald und Roos, 1993), *Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase* (HXGPRT) (Donald et al., 1996) und *Tryptophan-Synthase* (Sibley et al., 1994). Die Wirtszellen werden durch die angewendeten Selektionen nicht in Mitleidenschaft gezogen. Diese Marker werden

sowohl für die homologe Rekombination (Donald und Roos, 1994; Kim et al., 1993), die lange flankierende Regionen chromosomaler DNA erfordert, als auch für die Insertions-Mutagenese (Donald und Roos, 1995; Knoll und Boothroyd, 1998) verwendet. Lineare Vektoren integrieren bevorzugt zufällig ins Genom. Das HXGPRT-Gen kann sowohl für die positive Selektion (mit Mycophenolsäure) als auch zur negativen Selektion verwendet werden (mit 6-Thioxanthin) (Donald et al., 1996). Da allerdings HXGPRT normalerweise vom Parasiten exprimiert wird, jedoch nicht essentiell ist, wurde dieses Gen im *T. gondii* RH und Prugniaud Stamm entfernt, um Selektionen überhaupt zu ermöglichen. Als Reportergene eignen sich die von *E. coli* abgeleitete β -Galaktosidase (Seeber und Boothroyd, 1996), *Chloramphenicolacetyltransferase* (Soldati und Boothroyd, 1993) und modifizierte Versionen von *GFP* (Striepen et al., 1998).

1.2 *Microbodies*

Die Organellgruppe der *microbodies* umfasst die Peroxisomen, die Glyoxysomen keimender Samen sowie die in der Ordnung der Kinetoplastiden vorkommenden Glykosomen. Erst kürzlich wurde der sogenannte Woronin-Körper identifiziert, bei dem es sich um ein spezialisiertes Peroxisom handeln muss (Jedd und Chua, 2000). *Microbodies* kommen in fast allen eukaryontischen Zellen (Waterham und Cregg, 1997) vor, sind von nur einer Membran umgeben und besitzen keine eigene DNA oder Ribosomen. Entdeckt wurden sie 1954 von Rhodin in Nierenzellen von Mäusen, und de Duve und seine Mitarbeiter zeigten, dass sie der Ort vieler H_2O_2 -generierender oxidativer Prozesse sind (Waterham und Cregg, 1997). Dies spiegelt sich in der funktionellen Bezeichnung „Peroxisomen“ wider. Das Markerprotein für Peroxisomen ist das Enzym Katalase, welches z. B. das bei der β -Oxidation während des Dehydrierungsschritts entstehende Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff zerlegt. Peroxisomen enthalten in der Regel mindestens eine Wasserstoffperoxid-erzeugende Oxidase und die der Detoxifizierung dienende Katalase (De Duve und Baudhuin, 1966).

Die Bezeichnung „Glyoxysomen“ weist auf das Vorhandensein des Glyoxylat-Zyklus in diesen Organellen hin, die in den keimenden Samen von Pflanzen vorkommen (Titus und Becker, 1985). Pflanzen besitzen auch Peroxisomen, darunter spezialisierte Formen in Blättern, die eng mit Chloroplasten assoziiert sind, wo sie ein Zwischenprodukt der Kohlenstoff-Assimilation unter O_2 -Verbrauch und CO_2 -Abgabe verarbeiten, ein Prozess, der an die Atmung (Respiration) tierischer Zellen erinnert und als Photorespiration bezeichnet wird.

Die Glykosomen erhielten ihren Namen durch das Vorhandensein der ersten 7-9 Enzyme der Glykolyse. Die letzten beiden Schritte der Glykolyse finden im Zytosol statt (Opperdoes, 1987). In *T. brucei* Glykosomen gibt es keine Katalase, andere Vertreter der Kinetoplastiden, wie *Phytomonas* (Sanchez-Moreno et al., 1992) und *Crithidia* (Opperdoes et al., 1977) enthalten jedoch Katalase in ihren Glykosomen.

Aufgrund des unterschiedlichen Proteingehalts und der damit verbundenen metabolischen Unterschiede (van den Bosch et al., 1992) wurden diese drei (oder mehr) Ausformungen eines Organelles lange Zeit nicht als eine zusammengehörende Gruppe identifiziert. Ihr Durchmesser liegt zwischen 0,1 – 1,5 µm. Je nach Organismus und Aufgaben der jeweiligen Zelle haben *microbodies* die unterschiedlichsten Funktionen. Gemeinsam ist ihnen allen die β-Oxidation von Fettsäuren. Trotz vieler Unterschiede zeigen die *microbodies* Gemeinsamkeiten in der Struktur und der Biogenese, so dass man von einer evolutionären Verwandtschaft ausgeht (Hannaert und Michels, 1994).

	Säuger-Peroxisomen	Hefe-Peroxisomen	Glyoxysomen	Glykosomen
β-Oxidation von Fettsäuren	Ja	Ja	Ja	Ja
Katalase	Ja	Ja	Ja	Spezies-abhängig
Etherlipid-Synthese	Ja	Nein	Nein	Ja
Glykolyse	Nein	Nein	Nein	Ja
Glyoxylat-Zyklus	Nein	Ja	Ja	Nein
Isoprenoid-Biosynthese	Ja	Nein	?	?
Purin- <i>salvage</i>	Nein	Nein	Nein	Ja

Tabelle 1.1: Übersicht über die Funktion verschiedener *microbodies*, entnommen aus M. Parsons *et al.*, MBP 115 (2001) 19-28.

Die β-Oxidation sehr langer (C₂₄ und größer), langer, und verzweigter Fettsäuren findet bei Tieren in den Peroxisomen statt. Der Großteil dieses Stoffwechselweges, die Oxidation langer, medium und kurzer Fettsäuren, findet jedoch in den Mitochondrien statt (Mannaerts und Van Veldhoven, 1996); auch die in den Peroxisomen verkürzten Fettsäuren gelangen schließlich zum weiteren Abbau in die Mitochondrien. Die in den Peroxisomen entstandenen Produkte werden möglicherweise in der peroxisomalen Isoprenoid- und Etherlipid-Biosynthese verwendet (Mannaerts und Van Veldhoven, 1996).

In Pilzen und Pflanzen jedoch findet die β-Oxidation ausschließlich in den Peroxisomen statt.

1.2.1 Bedeutung der *microbodies*

Die Notwendigkeit für die Kompartimentierung des peroxisomalen Metabolismus und die Separierung vom Rest der Zelle ist nicht völlig klar, da viele der *Reactive Oxygen Species* (ROS) membrandurchgängig sind (Yu, 1994).

Bei den Glykosomen wurde zunächst angenommen, dass durch die Kompartimentierung der Durchsatz der Glykolyse mit Hilfe der limitierenden Diffusion der Metabolite verbessert sei (Oppendoes, 1987). Spätere Studien, die auf der Berechnung der theoretischen Durchflussrate basierten, legen nahe, dass die Diffusion der Substrate nicht limitierend für die Glykolyse sein sollte (Bakker et al., 2000). Die Kompartimentierung scheint am wichtigsten für die Regulierung der im Glykosom enthaltenen metabolischen Prozesse zu sein (Parsons et al., 2001).

Die Wichtigkeit von Peroxisomen beim Menschen wird durch einige genetische Funktionsstörungen deutlich, die das Organell betreffen (Moser et al., 1991). Zu unterscheiden sind hier die Störungen, die von einem Defekt in einem einzelnen peroxisomalen Enzym herrühren, wie z. B. der Thiolase, oder der AcylCoA-Oxidase, und Funktionsstörungen, die auf einer Störung der Biogenese des Organells beruhen (Moser et al., 1991) und daher alle in den *microbodies* ablaufenden metabolischen Funktionen betreffen und als PBDs, *Peroxisome Biogenesis Disorders*, bezeichnet werden. Ihre Ursache sind Mutationen in den PEX-Genen (s. Abschnitt 1.2.2). Zu den PBDs gehören z. B. das Zellweger Syndrom (ZS) und die milderen Formen dieser Krankheit, die Neonatale Adrenoleukodystrophy (NALD) und die Rhizomelische Chondrodysplasia Punctata.

1.2.2 Biogenese der *microbodies*

Die Biogenese der *microbodies* erfordert die Bildung einer Lipid-Doppelschicht, den Import von Membranproteinen in diese Doppelschicht sowie den Transport von löslichen Proteinen in die Peroxisomenmatrix. In Organismen, bei denen dieser Prozess untersucht wurde, identifizierte man bisher 24 Gene (nicht alle sind in allen Organismen gefunden worden), die für Proteine kodieren, die in die Peroxisomen-Biogenese involviert sind. Man nennt sie PEX-Gene, und ihre Proteine Peroxine. Die Peroxine können unterteilt werden in jene, die ausschließlich für den Import von Matrixproteinen zuständig sind, und in solche, die in die Membranbiogenese des Peroxisoms involviert sind.

Um den Peroxisomenbestand einer sich teilenden Zelle aufrechtzuerhalten, muss er vervielfacht und auf die Tochterzellen weitergegeben werden (Tabak et al., 1999). Da Membranen nicht *de novo* synthetisiert werden, können Peroxisomen über zwei Wege vermehrt werden: Im ersten Falle würden sich bestehende Peroxisomen durch den direkten Import von Proteinen aus dem Zytosol sowie Lipideinlagerung vergrößern, und sich durch einen Spaltungs- bzw. Knospungsmechanismus teilen (Lazarow und Fujiki, 1985). Es handelt sich hier um das klassische Modell der Peroxisomenproliferation. Eine zweite und heftig diskutierte Möglichkeit ist die Rekrutierung von Membranen und wichtigen Membranproteinen von einem anderen vesikulären Kompartiment wie z. B. dem Endoplasmatischen Retikulum. Erschwert wird die Problematik durch sich teilweise widersprechende Ergebnisse in unterschiedlichen Organismen. Hinweise für das ER-Modell wurden hauptsächlich in *Yarrowia lipolytica* gewonnen (Titorenko und Rachubinski, 1998).

1.2.3 Import von Matrix- und Membranproteinen

Die meisten der bisher identifizierten Peroxine sind am Import von löslichen *microbody*-Proteinen in die Matrix des Organells beteiligt. Der Import von Matrixproteinen in *microbodies* ist ungewöhnlich, da die Proteine im gefalteten oder sogar oligomerisierten Zustand (Titorenko et al., 2002) in das Organell gelangen können. Komplett gefaltete Polypeptide, über Disulfidbrücken und chemisch quervernetzte Proteine sowie mit HSA-SKL (siehe unten) konjugierte Goldpartikel wurden in Peroxisomen transportiert (Walton et al., 1995). In Glykosomen wurden gefaltete, stabilisierte Fusionsproteine importiert (Hausler et al., 1996), und Proteine, die kein *Peroxisomal Targeting Signal* (PTS) besitzen und zur Oligomerisierung fähig sind (Lee et al., 1997) wurden in *microbodies* importiert, sofern sie mit PTS-Signal-enthaltenden Untereinheiten (des gleichen Proteins) koexprimiert wurden.

Es existieren drei PTS-Signale: Die beiden gut charakterisierten Signale PTS1 und PTS2 sowie PTS3.

Die meisten peroxisomalen Matrix-Proteine besitzen ein PTS1 Signal, wobei es sich um ein Tripeptid am C-Terminus handelt. Das erste identifizierte PTS1-Signal war Ser-Lys-Leu (SKL) (Gould et al., 1987). Die Konsensussequenz wurde 1989 von Gould *et al.* definiert als (S/A/C)-(K/R/H)-L (Gould et al., 1989) bzw. inzwischen als (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) (Subramani, 1998). Seither wurden weitere Variationen dieser Sequenz getestet, sowohl was die Länge als auch was die Aminosäureabfolge an sich betrifft (Blattner et al., 1992; Mullen et al., 1997). Es wurde deutlich, dass verschiedene Organismen unterschiedliche Signale

tolerieren, und dass es offenbar mehr Möglichkeiten gibt, als tatsächlich PTS1-Signale in der Natur vorkommen (Purdue und Lazarow, 2001). Es ist deshalb schwierig, einen endgültigen Konsensus zu finden. Der Rezeptor für PTS1 Signale ist das Peroxin 5 (Pex5p). Es ist ein zytosolischer Rezeptor, der sich zwischen Zytosol und Peroxisomenmatrix hin- und herbewegt und seine Ladung zum Peroxisom bringt (Dammai und Subramani, 2001).

Einige Proteine besitzen auch PTS2 Signale, wobei es sich um ein Nonapeptid handelt, welches nahe oder am N-Terminus lokalisiert ist. Die Konsensussequenz lautet (R/K)-(L/V/I)-(XXXXX)-(H/Q)-(L/A/F) (Purdue und Lazarow, 2001). Das erste PTS2 wurde in der Ratten-Thiolase entdeckt (Swinkels et al., 1991) und inzwischen in weiteren Proteinen anderer Organismen detektiert. Der Import-Rezeptor ist das Peroxin 7 (Pex7p). Auch Pex7p scheint sich zwischen Zytosol und Peroxisomenmatrix zu bewegen (Elgersma et al., 1998), um seine Ladung (Proteine mit PTS2-Signal) ans Peroxisom zu liefern.

PTS3 Signale sind noch nicht charakterisiert und wurden z. B. auf der peroxisomalen AcylCoA-Oxidase von *S. cerevisiae* gefunden, die weder ein PTS1 noch ein PTS2 Signal besitzt (Skoneczny und Lazarow, 1998). Dieses Protein ist jedoch von Pex5p ebenso abhängig wie Proteine mit dem PTS1 Signal.

An der Peroxisomenmembran konvergiert der Import von Matrixproteinen, da die Rezeptoren eine gemeinsame Andockungsstelle besitzen: Pex13p und Pex14p.

1.3 Oxidativer Stress, *Reactive Oxygen Species* (ROS), antioxidative Abwehr

Oxidasen generieren häufig unvollständig reduzierte Sauerstoff-Derivate. Das Superoxid-Anion wird durch eine Ein-Elektronreduktion von O₂, Wasserstoffperoxid durch Zwei-Elektronenreduktion von O₂, und das Hydroxyl-Radikal durch eine Drei-Elektronenreduktion von O₂ erzeugt. Das Superoxid-Anion ist nicht besonders toxisch, aufgrund des ungepaarten Elektrons jedoch kann es sich mit Stickoxid (auch ein Radikal) zu Peroxynitrit verbinden, welches die Peroxidation von Lipiden bewirken kann. Die genannten Verbindungen sind allesamt reaktiver als das O₂ selbst und werden als *Reactive Oxygen Species* (ROS) bezeichnet. Das Hydroxylradikal ist besonders reaktiv, und bisher sind keine Enzyme bekannt, die es detoxifizieren können. Es kann DNA, Proteine und Lipide schädigen.

Dennoch entstehen im normalen Zell-Metabolismus relativ große Mengen an ROS. Die Zelle befindet sich dann in einer oxidativen Stress-Situation und muss Wege finden, mit diesem

Stress umzugehen. Dies tun Zellen seit der Entstehung von Sauerstoff in der Atmosphäre, und es sind sowohl Enzyme als auch nichtenzymatische Antioxidantien beteiligt.

Bei den Enzymen steht die Superoxid-Dismutase an der vordersten Front, sie dismutiert, wie der Name schon sagt, das Superoxid-Anion in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Das entstehende Wasserstoffperoxid muss seinerseits schnell detoxifiziert werden, da ansonsten Hydroxylradikale entstehen. Dies wird entweder durch das Enzym Katalase vollzogen, wodurch Sauerstoff und Wasser entstehen, oder aber durch Peroxidasen, die die Detoxifizierung mit Hilfe der Oxidation eines organischen Substrates, wie Glutathion, bewerkstelligen.

Unter den nichtenzymatischen Antioxidantien befinden sich z. B. das Glutathion, die lipidlöslichen Substanzen α -Tocopherol (Vitamin E) sowie das β -Carotin, die eine große Rolle bei der Verhinderung von Schäden an Membranen spielen; ebenso gehören das wasserlösliche Vitamin C und Harnsäure zu der Gruppe der Antioxidantien.

1.3.1 Katalasen

Katalasen bewirken, wie bereits unter 1.3 erwähnt, die Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Strukturell, funktionell und evolutionär unterteilt man sie in drei Gruppen (von Ossowski et al., 1993):

- 1.) Die „typischen“ Katalasen, homotetramere, Häm-enthaltende Proteine mit einer Größe von 200-340 kDa.
- 2.) Die bifunktionellen Katalase-Peroxidasen, die ebenfalls Häm enthalten. Über diese Gruppe gibt es keine detaillierten strukturellen Informationen. Sie sind wahrscheinlich durch Gen-Duplikation entstanden. Sie haben eher Sequenzähnlichkeiten mit pflanzlichen Peroxidasen als mit Katalasen (Klotz et al., 1997) und wurden in allen drei Organismenreichen gefunden, in Eukaryonten bisher jedoch nur in Pilzen (Fraaije et al., 1996; Levy et al., 1992).
- 3.) Die Mangan-Katalasen („Pseudokatalasen“ (Kono und Fridovich, 1983), da sie Mangan anstelle von Eisen verwenden), die ein Reaktionszentrum mit zwei Manganionen besitzen, sind eventuell mit den Mangan-*clustern* im Photosystem II der Pflanzen verwandt. Sie wurden bisher nur in Milchsäurebakterien (Beyer und Fridovich, 1985) und thermophilen Organismen beschrieben. Da keine signifikante

Ähnlichkeit mit anderen Proteingruppen besteht, ist anzunehmen, dass es sich hier um eine eigenständige evolutionäre Proteingruppe handelt.

In jüngerer Zeit sind Katalasen aus folgenden Gründen wieder in den Fokus der Wissenschaft gerückt: Es verdichten sich die Hinweise, dass Katalasen eine große Rolle in einer Reihe von pathogenen Zuständen spielen, wie z. B. Krebs, Diabetes, Altern und oxidativem Stress (DeLuca et al., 1995; Feuers et al., 1993). Zudem sind die Wirkmechanismen, wie ihre Aktivierung bzw. Inaktivierung, bei weitem noch nicht verstanden.

Die typischen Katalasen bilden die größte der 3 Subgruppen, und Mitglieder dieser Gruppe werden in fast allen aerob lebenden Organismen, Prokaryonten wie Eukaryonten, gefunden, bisher jedoch noch nicht bei den Archaeobakterien. Typische Katalasen werden durch das *suicide* Substrat 3-Amino-1,2,4-triazol (AT) irreversibel inhibiert; ein weiteres Kennzeichen, welches sie von den Katalase-Peroxidasen unterscheidet ist, dass ihre Häm-Gruppe nicht sofort von Natriumdithionit reduziert wird.

1.3.1.1 Struktur von typischen Katalasen

Typische Katalasen besitzen eine konservierte Kernregion, die sogenannte „*core region*“ (Klotz et al., 1997), die circa 390 Aminosäurereste umfasst. In der Katalase A von *S. cerevisiae* sind dies die Aminosäuren 70 bis 460 (Zamocky und Koller, 1999). Innerhalb dieser Region herrscht eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen allen Katalasen. Jenseits dieser Kernregion, sowohl C- als auch N-terminal, divergieren die Sequenzen mehr. In der Gruppe der typischen Katalasen befinden sich auch einige sogenannte *large subunit* Katalasen, die aus Katalase-Monomeren mit einer Länge von ca. 650 Aminosäuren bestehen (in den Katalasen mit normaler Untereinheitsgröße sind es etwa 480 Aminosäuren) und eine Größe von etwa 80 kDa (normale Katalasen 50-65 kDa) haben. Diese Katalasen besitzen noch Sequenzähnlichkeiten am verlängerten Carboxyterminus. Der N-Terminus ist um 70 Aminosäuren, der C-Terminus um etwa 150 Aminosäuren verlängert, was zu einer Stabilisierung der ganzen Kern-Region führt, so dass diese Enzyme aus großen Untereinheiten bei 70°C oder in Anwesenheit von denaturierenden Substanzen noch aktiv sind (Klotz et al., 1997).

Typische Katalasen werden nochmals in 3 Gruppen unterteilt, wovon die Katalasen mit großen Untereinheiten die Gruppe II bilden, sie wurden bisher nur in Bakterien und Pilzen gefunden (Klotz et al., 1997). Aufgrund von DNA Sequenzvergleichen wurde der

horizontale Katalase-Gen-Transfer zwischen Eukaryonten und Prokaryonten als möglicher Vorgang vorgeschlagen (Mayfield und Duvall, 1996). Die Gruppe III enthält unter anderem Katalase-Sequenzen von Bakterien, von denen viele parasitär leben (Zamocky und Koller, 1999). Interessanterweise haben Bakterien mit einer eingeschränkten, also parasitären Umgebung, die eine Gruppe III Katalase besitzen, in der Regel nur dieses eine Isozym, wie z. B. *Heliobacter pylori* (Odenbreit et al., 1996), *Bacteroides fragilis* (Rocha und Smith, 1995) und *Haemophilus influenza* (Fleischmann et al., 1995). Bakterien mit einem breiter gefächerten Lebensraum hingegen besitzen mehrere Isozyme von unterschiedlichen Katalase-Gruppen, wie z. B. *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas putida*, die Katalasen der Gruppe II und III haben. Zur Gruppe III Katalasen gehören außer den bakteriellen Katalasen auch Tier und Pilz-Katalasen. Die Gruppe I Katalasen besteht aus den Pflanzen- und wiederum Bakterien-Katalasen.

Bei den typischen Katalasen können in einem Monomer folgende Strukturregionen unterschieden werden (Zamocky und Koller, 1999), die Aminosäure-Angaben beziehen sich auf die *S. cerevisiae* Katalase A:

- Der N-terminale Arm, der aus den ersten ca. 70 Aminosäuren besteht, es folgt
- die sogenannte β -barrel (β -Faltblatt in Form einer geschlossenen Trommel) Domäne, Aminosäuren 72-318
- die Verbindungsdomäne, die auch als *wrapping* Domäne bezeichnet wird, Aminosäuren 319-439 sowie die
- α -helikale Domäne, Aminosäuren 440-503
- bei den typischen Katalasen mit großen Untereinheiten folgt noch eine Extra-Domäne von circa 150 Aminosäuren, die häufig als Flavodoxin-artige Domäne bezeichnet wird.

Extrem gut ist die β -barrel Domäne in Prokaryonten und Eukaryonten konserviert, gefolgt von der α -helikalen Domäne, die etwas variabler ist. Die größte Divergenz ist in den C- und N-terminalen Domänen zu finden. Des weiteren wird zwischen einer distalen und einer proximalen Seite der prosthetischen Häm-Gruppe unterschieden (in *S. cerevisiae* Katalase A von Aminosäurerest 51-168 bzw. 339-373).

Die N-terminale Domäne ist maßgeblich an der Bildung einer knotenartigen Struktur zwischen den einzelnen Untereinheiten beteiligt (Melik-Adamyan et al., 1986), so dass der Großteil zwischen benachbarten Untereinheiten verborgen ist. Im C-terminalen Teil der N-terminalen Domäne befindet sich auch das essentielle distale Histidin (Histidin 70), das in allen Häm-Katalasen vorhanden ist und das richtige Binden und Reduzieren eines Peroxidmoleküls erlaubt. An diese Aminosäure bindet der Inhibitor AT (3-Amino-1,2,4-triazol) kovalent, zudem bildet AT Wasserstoffbrücken mit Asparagin 143 (Zamocky und Koller, 1999).

Die β -barrel Domäne ist von allen Domänen die größte und hat in fast allen typischen Katalasen eine identische Länge; sie stellt den am meisten konservierten Teil dar und enthält viele katalytisch und strukturell wichtige Aminosäuren. Ein Teil dieser Domäne befindet sich an der Oberfläche und erlaubt den Kontakt einzelner Untereinheiten. Diese Domäne besteht aus acht antiparallelen β -Strängen, die in den Wendepunkten insgesamt sechs α -helikale Bereiche haben (Fita und Rossmann, 1985). Im internen Teil befinden sich wichtige Reste wie Histidin 70 (markiert das Ende der N-terminalen Domäne), Serin 109 und Asparagin 143 (Nummerierung bezieht sich auf die *S. cerevisiae* Katalase A). Zusammen mit sperrigen Resten aus anderen Bereichen bilden sie den typischen und hochkonservierten distalen Hohlraum (Kanal), der die prosthetische Gruppe (das Häm) beherbergt. Der Substratkanal bildet eine Verbindung von der Oberfläche zur Hämgruppe. Die tieferen Bereiche dieses Kanals erlauben nur kleinen Substraten, die tief liegende Hämgruppe zu erreichen (Reid et al., 1981). Des Weiteren ist die β -Domäne mit einigen Aminosäuren an der Bindung des Cofaktors NADPH beteiligt (Zamocky und Koller, 1999).

Interessanterweise besitzt ein großer Teil der β -barrel Domäne strukturelle Ähnlichkeiten mit Mitgliedern der Calycin Familie, die bei keiner signifikanten Sequenzähnlichkeit eine gemeinsame antiparallele β -barrel Struktur besitzen. Ein Mitglied dieser Familie ist das Streptavidin.

Die Verbindungsdomäne ist in einer großen Kuhle der β -barrel Domäne eingebettet. Es handelt sich um einen relativ strukturlosen Bereich, bis auf eine α -Helix, in der sich Tyrosin 355 (Katalase A), der proximale Häm-Ligand, befindet. Darüber hinaus bilden Bereiche dieser Domäne Schlaufen, durch die sich die N-terminale Domäne einer anderen Untereinheit durchschlängelt.

Die α -helikale Domäne ist moderat konserviert zwischen den einzelnen Katalasen und dockt an die Oberfläche des β -barrel an. Sie enthält vier aufeinanderfolgende α -Helices. Bei Katalasen, die NADPH binden, bilden Aminosäuren der ersten dieser Helices einen Teil der Kuhle, die den Adeninteil dieses Cofaktors beherbergt: Es gibt Katalasen, die NADPH nicht, moderat oder fest binden (Zamocky und Koller, 1999).

Auch diese Domäne hat eine strukturelle Homologie, und zwar zur sogenannten „Armadillo repeat region“ des Nager Proteins β -Catenin (3BCT, (Huber et al., 1997)) Diese Superhelix aus Helices vermittelt die Bindung von Cadherinen (meist Transmembran-Glykoproteine, die die Membran nur einmal durchspannen), Zell/Zell Adhärenzverbindungen und Transkriptionsfaktoren, wodurch Komplexe entstehen, welche wiederum mit dem Aktinfilamentnetz verknüpft sind (Hoschuetzky et al., 1994). Genau wie es beim Armadillo Motiv der Fall ist, akkumulieren typische Katalasen auf ihrer zur wässrigen Phase exponierten Seite positiv geladene Aminosäuren. Im Moment gibt es noch keine Hinweise für eine funktionelle Übereinstimmung dieser Struktur in Katalasen.

1.3.1.2 Quartärstruktur typischer Katalasen

Hauptsächlich Pflanzen haben häufig mehrere Katalase-Isoformen und auch mehrere Katalase-Gene. Tabak (*Nicotiana tabacum*) z. B. besitzt etwa 6-12 Katalase Isoenzyme (Durner und Klessig, 1996). Typische Katalasen können aus Homo- und aus Heterotetrameren bestehen (Ni und Trelease, 1991), wobei selbst in der Tabak-Pflanze der Großteil der Katalasen aus Homotetrameren besteht, Heterotetramere jedoch keine Seltenheit sind. Deshalb haben verschiedene Isomere, die aus einer Pflanze isoliert wurden, auch häufig ungleiche katalytische Eigenschaften (Havir und McHale, 1990). Typische Katalasen sind also meist Homotetramere mit einer Größe zwischen 200-340 kDa, wobei jede Untereinheit eine prosthetische Häm-Gruppe besitzt. Meist handelt es sich um das Eisen (III)-Protoporphyrin IX. Säuger-Katalasen bestehen zwar nur aus einer Art Untereinheit, können jedoch trotzdem in mehreren, ineinander umwandelbare Formen vorkommen (Aebi et al., 1974). Die Unterschiede ergeben sich aus der Packung und der Mobilität der Monomere (Zamocky und Koller, 1999). Das Katalase-Tetramer ist relativ komplex aufgebaut, hierfür ist ein hochkoordinierter Prozeß nötig, der vom Monomer über das Dimer zum Tetramer hin verläuft, wobei Prolin 65 (Numerierung Hefe Katalase A) eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Bergdoll et al., 1997) und hochkonserviert ist. Die vier Häm-Gruppen sind im Tetramer gut verborgen. Über eine Kooperativität der einzelnen Untereinheiten ist bisher

nichts bekannt. Die Dissoziation der Untereinheiten wird durch extreme pH-Werte bewirkt (Sund et al., 1967). Die Renaturierung typischer Katalasen erweist sich als fast unmöglich.

1.3.1.3 Der Substratkanal und die Reaktivität von Katalasen

Der Substratkanal wirkt sich auf die Reaktivität der Katalasen aus. Katalasen können sowohl katalatisch als auch peroxidativ wirksam werden, wobei ersteres sehr viel effizienter ist (x1000). Die beiden Vorgänge unterscheiden sich im wesentlichen durch einen Elektronenpaar-Transfer (katalatischer Modus) bzw. einen Einzel-Elektron-Transfer. Eine Hypothese (Srivastava und Ansari, 1980) besagt, dass dies im engen Substratkanal, der zum aktiven Zentrum des Kanals führt, begründet ist. Der Umsatz von großen Peroxiden wie Phenolen und aromatischen Aminien ist durch sterische Einschränkungen stark begrenzt. Der Substratkanal, der in den unteren Teilen hydrophob ist, erlaubt nur die Diffusion kleiner Moleküle mit niedriger Polarität (wie z. B. Wasserstoffperoxid). Eventuell reihen sich die Wasserstoffperoxidmoleküle in diesem Kanal sogar hintereinander, was den schnellen Umsatz erklären würde.

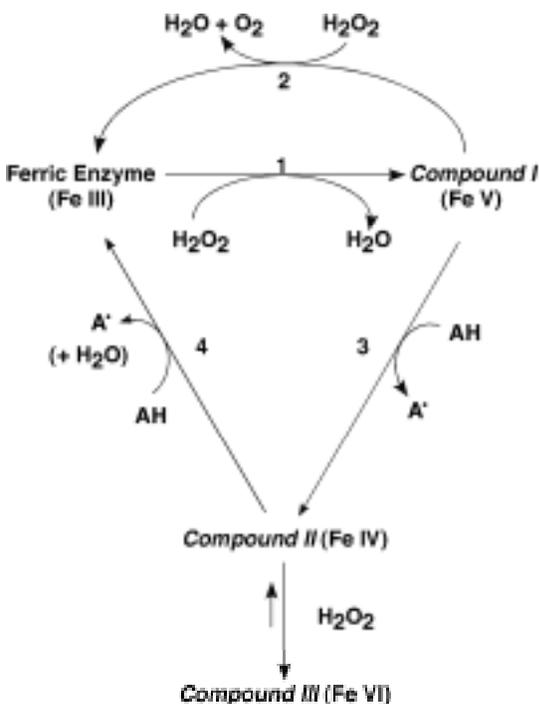


Abb. 1.3 Die Reaktionszyklen von Katalasen, in Klammern sind die Oxidationsstufen des Häm-Eisens angegeben. Katalatischer (α -) Zyklus: **1** Eine $2e^-$ äquivalente Reduktion von H_2O_2 zu H_2O , wodurch aus Fe^{3+} Fe^{5+} wird (*Compound I*). **2** *Compound I* wird durch eine $2e^-$ äquivalente Reduktion und der damit einhergehenden Oxidation eines zweiten Moleküls H_2O_2 wieder in das Fe^{3+} enthaltende Enzym umgewandelt. **2** Moleküle H_2O_2 werden folglich in $2 H_2O$ und O_2 dismutiert. **3** Peroxidativer (β -) Zyklus: *Compound I* wird durch eine $1e^-$ äquivalente Reduktion in die für den α -Zyklus inaktive *Compound II* umgewandelt. **4** Durch eine nochmalige Reduktion kann das Enzym wieder in den Ausgangszustand versetzt werden. AH: Elektronendonator, z. B. Phenol. A[•]: Radikal. *Compound III*: Inaktive Form der Katalase, entsteht bei hohen H_2O_2 Konzentrationen und ist nicht leicht wieder in *Compound II* umzuwandeln. Aus J. Durner und D. Klessig, *J. Biol. Chem.*, Vol. 271, S. 28492-501.

Wichtig: Ein kleiner Teil *Compound I* kann auch spontan, in Abwesenheit eines Elektronendonors, in *Compound II* umgewandelt werden. Darüber hinaus kann die inaktive *Compound III* nicht weiter durch 2-Elektronen Substrate wie H_2O_2 oder Alkohole reduziert werden.

1.3.1.4 Die Rolle von NADPH in typischen Katalasen

Aufgrund von Sequenzhomologien kann inzwischen davon ausgegangen werden, dass der Großteil typischer Katalasen NADPH bindet. Ob dies auch auf Pflanzen-Katalasen zutrifft, ist unklar (Durner und Klessig, 1996; Zamocky und Koller, 1999), da sie eine eigene evolutionäre Untergruppe bilden (Guan und Scandalios, 1996). Mögliche Funktionen von NADPH: Es verhindert die Bildung der *Compound II* und macht sie rückgängig. Das NADPH erhöht also die effektive Konzentration an *Compound I*, zusätzlich scheint es das tetramere Enzym zu stabilisieren (Zamocky und Koller, 1999). Es gibt auch Hinweise, dass NADPH die Bindung von Katalasen an ihre eigene mRNA reguliert (Clerch et al., 1996).

1.3.1.5 Lokalisation typischer Katalasen

Eukaryontische Katalasen sind das Markerenzym von Peroxisomen, und man geht davon aus, dass sie via PTS1-Weg in dieses Organell gebracht werden (Didion und Roggenkamp, 1992; Mullen et al., 1997; Purdue et al., 1996; Trelease et al., 1996). Entspricht das PTS1 nicht dem kanonischen Importsignal –SKL, sind häufig weitere, stromaufwärts gelegene Sequenzen wichtig (Mullen et al., 1997; Purdue et al., 1996). Ob Katalasen bereits im Zytosol als funktionelle Tetramere vorliegen (und dann evtl. an der Peroxisomen-Membran wieder dissoziieren), oder erst im Organell zusammengesetzt werden, bleibt Gegenstand von Diskussionen (Brul et al., 1988; Middelkoop et al., 1993; Yamamoto et al., 1988).

1.3.2 Peroxidoxine

Peroxidoxine (auch als Peroxiredoxine bezeichnet) bilden eine Klasse antioxidativer Enzyme, die in vielen Organismen, von Archaeobakterien bis zu Säugern, vorkommen, was auf das Alter und die Bedeutung dieser Enzyme schließen lässt (McGonigle et al., 1998). Die ursprüngliche Bezeichnung lautete *TSA*, *Thiol Specific Antioxidant*, wobei es sich um ein Peroxidoxin aus *S. cerevisiae* handelte. Die Bezeichnung *TSA* drückt die Abhängigkeit dieser Enzyme von Thiolen aus, um ihre protektive Funktion im *metal-catalyzed oxidation (MCO)*-System zu erfüllen (Kim et al., 1988). Sie unterscheiden sich von den klassischen Enzymen

Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase (GPx) und Katalase dadurch, dass sie z. B. keine Metallionen oder prosthetische Gruppen als Redox-Cofaktoren benötigen (Kim et al., 1988). Ihre Aktivität beruht auf dem Cystein47 (Nummerierung bezieht sich auf TPx (Thioredoxin-Peroxidase aus Hefe). Zu ihren Substraten zählen z. B. Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit und Alkylhydroperoxid (Barr und Gedamu, 2001).

Die Peroxidoxine selbst werden wiederum in 2 Gruppen unterteilt, je nach Vorhandensein von entweder einem oder zwei konservierten Cysteinen (McGonigle et al., 1998), namentlich Cystein47 bzw. Cystein170 (Nummerierung Hefe TPx). 1-Cys Peroxidoxine enthalten nur Cystein47, 2-Cys Peroxidoxine Cystein47 und Cystein170. Beide Gruppen unterscheiden sich durch eine konservierte Sequenz, die das Cystein47 umgibt: 1-Cys Peroxidoxine sind durch die Sequenz „PVCT“, 2-Cys Peroxidoxine durch die Sequenz „FVCP“ gekennzeichnet (Henkle-Duhrsen und Kampkotter, 2001). Peroxidoxine sind Homodimere, in denen die Monomere antiparallel angeordnet sind (Seo et al., 2000).

Die Reaktionsmechanismen beider Gruppen sind unterschiedlich:

1-Cys Peroxidoxine werden am N-terminalen Cys-SH (Cys47) durch Peroxide zu Sulfensäure oxidiert, die durch nichtphysiologische Thiole wie DTT reduziert werden kann. Ob Thioredoxine diese Funktion erfüllen, wird diskutiert (Kang et al., 1998; Krnajski et al., 2001). Nach dem physiologischen Elektronendonator wird deshalb noch gesucht.

Bei 2-Cys Peroxidoxinen erfolgt auch eine Oxidation des Cys47 zur Sulfensäure. Diese reagiert jedoch sofort mit dem Cys-SH, in diesem Falle Cys170, der anderen Untereinheit, unter Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke. Dieses Disulfid wird dann spezifisch von Thioredoxin reduziert. Inzwischen wurde auch ein Säuger 1-Cys Peroxidoxin gefunden, welches ein intramolekulares Disulfid-Intermediat bildet, das durch Thioredoxin reduziert werden kann (Seo et al., 2000). Interessant ist, in welchen Mengen diese Proteine in der Zelle vorkommen: In *S. cerevisiae* sind dies 0,7 % des löslichen Gesamtproteins (Kim et al., 1989). Sie schützen Proteine, DNA und Lipide vor der Schädigung durch ROS (Kim et al., 1988; Lim et al., 1993). Von der Hefe TPx wurde berichtet, dass sie nur von Thiolen reduziert und damit aktiviert wird (Kwon et al., 1994). Man nimmt an, dass 1-Cys Peroxidoxine nur kleine chemische Reduktantien (wie DTT) für das Aufrechterhalten ihrer Aktivität benötigen, das natürliche in der Zelle vorkommende Reduktans wurde noch nicht gefunden; 2-Cys Peroxidoxine benötigen entweder ein Protein z. B. AhpF, um reduziert zu werden, oder aber zwei, wie Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase (McGonigle et al., 1998).

Batra *et al.* gehen davon aus, dass das Überleben eines Parasiten im Wirt von seiner Ausstattung mit antioxidativen Enzymen abhängt (Batra *et al.*, 1992). In vielen Parasiten fehlen jedoch Komponenten der klassischen antioxidativen Enzyme wie Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase, so dass die Peroxidoxine als Enzymklasse angesehen werden, die diese Funktionen übernehmen bzw. ausgleichen. Sie detoxifizieren hauptsächlich H_2O_2 (Henkle-Duhrsen und Kampkotter, 2001). Gerade auch die Tatsache, dass einige Peroxidoxine sekretiert werden (McGonigle *et al.*, 1997), macht sie im Zusammenhang mit Parasiten interessant, es wird ihnen aber auch eine Rolle in der Zellhomöostase zugerechnet (McGonigle *et al.*, 1998). Sie konnten auch im Zytosol (Son *et al.*, 2001), in Mitochondrien (Barr und Gedamu, 2001) in Peroxisomen (Seo *et al.*, 2000) sowie im Nukleus (Stacy *et al.*, 1999) und an der Zelloberfläche (McGonigle *et al.*, 1998; Torian *et al.*, 1990) nachgewiesen werden.

Es gibt auch Versuche, diese Enzyme zur Vakzinierung einzusetzen (Soong *et al.*, 1995). Vermutet wird, dass ein Peroxidoxin aus *Entamoeba histolytica* für die Pathogenität des normalerweise kommensalisch lebenden Parasiten verantwortlich zeichnet (Flores *et al.*, 1993). Zudem gibt es Hinweise, dass die Vakzinierung mit rekombinantem 1-Cys Peroxidoxin aus dem apicomplexen Parasiten *Eimeria tenella* Schutz gegen eine Infektion mit dem Parasiten bietet (Schaap *et al.*, 2001).

Viele Organismen, wie z. B. Säuger, besitzen mehrere Peroxidoxine. Bei Helminthen wurde gezeigt, dass die Peroxidoxine stadienspezifisch lokalisieren und unterschiedlich exprimiert werden, was auf eine Adaptation der Parasiten an verschiedene Arten des oxidativen Stresses hinweist (McGonigle *et al.*, 1998). In *Leishmania chagasi* wurden ebenfalls drei unterschiedlich exprimierte 2-Cys Peroxidoxine gefunden, wovon eines als Multimer existiert (Barr und Gedamu, 2001), ein öfters beobachtetes Phänomen (Alphey *et al.*, 2000). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass dieses Peroxidoxin sogar Hydroxylradikale detoxifizieren kann (Barr und Gedamu, 2001), eine Funktion, die bisher keinem Enzym zugeschrieben werden konnte.

Zusammen mit der in Bakterien beobachteten Funktion der Detoxifizierung von Peroxynitrit (Bryk *et al.*, 2000) weist dies auf eine Funktion als letzte Front der Abwehr gegen ROS hin. Darüberhinaus ist die TPx aus *S. cerevisiae* an der Induktion der Genexpression von Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase als Reaktion auf oxidativen Stress beteiligt (Ross *et al.*, 2000). Durch Ausschalten dieses Peroxidoxins wird die Induktion der Katalase T-Genexpression durch oxidativen Stress erhöht, d.h. der Verlust der Induktion durch

Wasserstoffperoxid findet bei diesem Enzym nicht statt (Ross et al., 2000). Eine Rolle als Dormanzfaktor in Pflanzen wird diskutiert (Lee et al., 2000; Stacy et al., 1999).

1.4 Zielsetzung

In Parasiten des Stammes Apicomplexa waren zu Beginn dieser Doktorarbeit noch keine *microbodies*, ein in fast allen Eukaryonten vorkommendes Organell (Waterham und Cregg, 1997), beschrieben worden. Zu den *microbodies* zählen auch die Peroxisomen. Durch das in *Toxoplasma gondii* durchgeführte EST (Expressed Sequences Tag) Projekt (Ajioka et al., 1998) war es uns möglich, zwei ESTs, deren abgeleitete Protein-Sequenzen Ähnlichkeit mit Katalase, dem Markerenzym von Peroxisomen zeigten, zu identifizieren.

Diese ESTs wurden zunächst in meiner Diplomarbeit bearbeitet und erwiesen sich nach der Sequenzierung als identisch. Durch einen *Southern Blot* mit genomischer *T. gondii* DNA wurde der parasitäre Ursprung der ESTs bestätigt. Das Katalase-Gen liegt als einfache Kopie vor. Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurden *Katalase*-positive Cosmide zur Verfügung gestellt, die genomische DNA des *T. gondii* RH Stammes enthielten.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte zunächst die gesamte Sequenz des *T. gondii* Katalase-Gens ermittelt werden, um sicher zu gehen, dass es sich tatsächlich um eine typische Katalase handelt. Um das Protein charakterisieren zu können, sollten Antikörper hergestellt werden. Mit Hilfe von Fraktionierungsmethoden sowie der Immunfluoreszenzanalyse sollte das Enzym innerhalb der Zelle lokalisiert und mögliche Peroxisomen identifiziert werden. Dies sollte durch Importstudien mit Fusionsproteinen, die aus dem Reporter-gen GFP (Green Fluorescent Protein) und dem C-terminalen PTS1-Signal (Peroxisomal Targeting Signal) zusammengesetzt sind, belegt werden. Um die Rolle der Katalase in dem intrazellulären Parasiten *T. gondii* studieren zu können, war ein Ausschalten des Katalase-Gens geplant. Durch Enzym-*assays* sollte die Funktionalität des Proteins bestätigt und seine Rolle unter oxidativen Stress-Bedingungen untersucht werden. Katalase-defiziente Toxoplasmen sollten anschließend im Mäusemodell auf ihre Virulenz getestet werden. Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung alternativer antioxidativer Enzyme/Enzymsysteme (Henkle-Duhrsen und Kampkötter, 2001; McGonigle et al., 1998), die potentiell in der Lage sind, die Funktion der Katalase zu übernehmen.

2. Material

2.1 Laborausstattung

Autoradiographiekassetten	Sigma
Brutschrank B5060 EC/CO ₂	Heraeus GMBH, Hanau
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Elektro Cell Manipulator 600	BTX, San Diego, USA
Elektrophorese Power supply Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Elektroporationsküvetten Plus	BTX, San Diego, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Filmentwicklungsmaschine	Amersham
Fluoreszenzmikroskop DMRXA	Leica, Wetzlar
Gel Fotoausdruck <i>Video Copy Processor</i>	Mitsubishi
Gelkammern für Agarosegele	ZMBH, Heidelberg
Glasplatten für SDS-PAGE	Biorad
Heizblock Bioblock Scientific	Barnstead/Thermolyne, USA
Hybridisierungsöfen Mini Hyb oven	MWG Biotech
Hybridisierungsröhren	HybAID
Labor pH Meter Toledo 320	Mettler, Göttingen
Magnetrührer IKA Combimag Reo	Janke und Kunkel, Staufen
PCR Maschine <i>Robocycler Gradient 96</i>	Stratagene
Photometer Ultraspec 3000	Amersham
Pipettierhilfen	Integra Biosciences
Rotoren GS3, GSA, SS34	Du Pont, USA
Schüttler Polymax 1040	Heidolph
SpeedVac Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Steril-Werkbank	BDK Luft- und Raumfahrttechnik
Über-Kopf Schüttler	Heidolph
Ultrazentrifugen	Beckman
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, NY
Waage Precision Plus	Ohaus, USA
Wasserbäder	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Sorvall Du Pont, Heraeus, Eppendorf

2.2 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin (Na-Salz)	Böhringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Merck, Darmstadt
CSPD	Böhringer, Mannheim
Cumolhydroperoxid	Sigma

DABCO	Sigma
DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
DMSO (zum Einfrieren)	Sigma
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Pharmacia
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haën
Ethidiumbromid	Serva
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Gibco
Gentamycin	Gibco BRL, Eggenstein
Giemsa-Lösung	Fluka
Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Glutaraldehyd	Böhringer Mannheim
Glycerin (wasserfrei)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Difco
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedel-de Haën
Mycophenolsäure	Sigma
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenol	Carl Roth
Ponceau S	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma
Trypsin	Eurobio
Tween20	Serva
Xanthin	Sigma

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck, Roth, Serva, Sigma, Baker, Riedel-deHaën, Pharmacia und Gibco BRL.

2.3 Verbrauchsmaterialien

Whatman 3 MM	Vetter, St. Leon-Rot
Objektträger für IFA	Menzel
Deckgläser für IFA	Hölzer, Dorfen
Zellkulturschalen	Renner

2.4 Verwendete Primärantikörper

T.g.: (*Toxoplasma gondii*), mAK: monoklonaler Antikörper

Epitop (#Peptid)	Spezies	Verdünnung <i>Western Blot</i>	Verdünnung IFA	Quelle
α T.g. Katalase (2131) Serum	Kaninchen (#84)	1:1000	1:500	Vorliegende Arbeit

α <i>T.g.</i> Katalase (2131) Serum	Kaninchen (#85)	1:1000	1:500	Vorliegende Arbeit
α <i>T.g.</i> Katalase (2132) Serum	Kaninchen (#96)	1:1000	1:500	Vorliegende Arbeit
α <i>T.g.</i> Katalase (2132) Serum	Kaninchen (#97)	1:1000	1:500	Vorliegende Arbeit
α <i>T.g.</i> Pxn1 (EP012322) Serum	Kaninchen (#1128)	1:750	1:500	Vorliegende Arbeit
α <i>T.g.</i> Pxn1 (EP012322) Serum	Kaninchen (#1129)	1:750	1:500	Vorliegende Arbeit
α <i>T.g.</i> MIC4 Serum	Kaninchen	1:1000	1:500	Dr.Susan Brecht, ZMBH
α <i>T.g.</i> MLC Serum	Kaninchen		1:500	Rolf Stratmann, ZMBH
mAK α Ty-1-tag (BB2-Ty-1)	Maus	1:1000	1:500-1:3000	Keith Gull, Manchester, GB
mAK α <i>T.g.</i> MIC3	Maus		1:1000	J.-F. Dubremetz, Lille, F
mAK α <i>T.g.</i> ROP2	Maus		1:1000	J.-F. Dubremetz, Lille, F
mAK α <i>T.g.</i> GRA3	Maus		1:1000	J.-F. Dubremetz, Lille, F
mAK α <i>D. discoideum</i> Aktin	Maus	1:1000		G. Gerisch, MPI, Martinsried
mAK α <i>T.g.</i> SAG4	Maus		1:1000	J.-F. Dubremetz, Lille, F

2.5 Verwendete Sekundärantikörper

2.5.1 Immunfluoreszenzanalyse

Alexa 488-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak	1:1000	Molecular Probes, Niederlande
Alexa 488-konjugierter Ziege- α -Maus-Ak	1:1000	Molecular Probes
Alexa 594-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak	1:1000	Molecular Probes
Alexa 594-konjugierter Ziege- α -Maus-Ak	1:1000	Molecular Probes

2.5.2 Western Blot-Analyse

HRP-konjugierter Esel- α -Kaninchen-Ak	1:1000	Amersham
HRP-konjugierter Schaf- α -Maus-Ak	1:1000	Amersham

2.6 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Peptide #2131 und #2132 wurden im Labor von R. Frank, ZMBH, synthetisiert. Die Immunisierung erfolgte im Tierlabor des ZMBH unter Leitung von J. Weiss. Das Peptid EP012322 wurde bei der Firma EUROGENTEC hergestellt, hier wurde auch die Immunisierung durchgeführt.

Imject-Maleimid aktiviertes *keyhole limpet hemocyanin* Pierce
Freund's Complete Adjuvants Sigma
Freund's Incomplete Adjuvants Sigma

Dialyseschläuche (MWCO 12000-14000)

Kaninchen NZW (weiße Neuseeländer)

Peptide:

Peptid-#	Aminosäure-Sequenz	Epitop/Aminosäure	Serum-#
2131	*CVDGFPKEDRNAAVSGT	<i>T.g.</i> Katalase/399-414	84/85
2132	CHPGQEHPNSDFE	<i>T.g.</i> Katalase/423-434	96/97
EP012322	DEEAKAKLPKGFEKKEC	<i>T.g.</i> Pxn1/193-209	1128/1129

*C-zusätzlich für die Kopplung eingeführtes Cystein

2.7 Mikrobiologische Methoden

2.7.1 Bakterien-Stämme

DH5 α *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15)*
hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (Promega)

2.7.2 Bakterienkultur

LB-Medium 10 g Trypton
 5 g Hefe-Extrakt

	10 g NaCl
	ad 1000 ml H ₂ O
LB-Platten	LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar

Ampicillin wurde für transformierte DH5 α - *E. coli* in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml in LB-Medium und LB-Platten eingesetzt.

2.7.3. Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien

Tfb I-Puffer	30 mM KOAc
	100 mM RbCl ₂
	10 mM CaCl ₂
	50 mM MnCl ₂
	15 % Glycerin
	pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren

Tfb II-Puffer	10 mM MOPS
	75 mM CaCl ₂
	10 mM RbCl ₂
	15 % Glycerin
	pH 6,5 mit KOH einstellen, sterilfiltrieren

2.7.4. Transformation kompetenter Bakterien

Ψ a-Medium	5 g Hefe-Extrakt
	20 g Bacto-Trypton
	5 g MgSO ₄
	in 800 ml H ₂ O lösen, pH 7,6 mit KOH einstellen
	14 g Bacto-Agar
	ad 1000 ml H ₂ O
Ψ b-Medium	wie Ψ a-Medium, jedoch ohne Bacto-Agar

2.8 Isolierung und Aufreinigung von DNA

2.8.1. Lösungen zur Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Lösung 1	50 mM Glucose
----------	---------------

	25 mM	Tris-HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA pH 8,0
Lösung 2	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
Lösung 3	5 M	Kaliumacetat
<i>Alternativ:</i>	<i>NucleoSpin Plasmid Column (Macherey und Nagel)</i>	
	Kieselerde-Säulchen	
Puffer A1	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA pH 8,0
	100 µg/ml	RNase A
Puffer A2	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
Puffer A3	M+N	
Puffer AW	M+N	
Puffer A4	M+N	
Puffer AE	M+N	

2.8.2. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Puffer P1	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA pH 8,0
	100 µg/ml	RNase A
Puffer P2	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
Puffer P3	2,55 M	Kaliumacetat pH 4,8
QBT-Puffer pH 7,0	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS
	15 %	Ethanol
	0,15 %	Triton X-100
QC-Puffer pH 7,0	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS
	15 %	Ethanol
QF-Puffer pH 8,2	1,25 M	NaCl
	50 mM	MOPS
	15 %	Ethanol
Tip500-Säulen	Qiagen	

2.8.3 Aufreinigung chromosomaler DNA aus *T. gondii*

DNA-Lysepuffer	120 mM	NaCl
	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1%	Sarkosyl
Proteinase K-Stammlösung	10 mg/ml	Serva
RNase A (aus Rinderpankreas)	10 mg/ml	Serva

2.8.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

<i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i> (Qiagen)	<i>QIAEX II Suspension</i> Puffer QX1 Puffer PE
--	---

2.9 Modifikation und Rekombination von DNA

2.9.1 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Amersham Pharmacia Biotech, New England Biolabs, Stratagene, MBI
Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche Molecular Biochemicals

Alle Enzyme wurden mit dem vom Hersteller mitgelieferten Enzympuffer verwendet.

2.9.2 Materialien für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Verwendete DNA-Polymerasen:

Taq-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs

PCR-Puffer und Zusätze:

10x Taq-DNA-Polymerase- Reaktionspuffer	100 mM	Tris-HCl pH 8,3
	500 mM	KCl
	15 mM	MgCl ₂
	0,01 % (w/v)	Gelatine
10x Pfu-DNA-Polymerase-	100 mM	KCl

Reaktionspuffer	200 mM	Tris-HCl pH 8,75
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	1%	Triton X-100
10x Vent-DNA-Polymerase-	100 mM	KCl
Reaktionspuffer	200 mM	Tris-HCl pH 8,8
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	20 mM	MgSO ₄
	1 %	Triton X-100
Betain 5 M		Sigma
Nukleotidmix	10 mM	dATP, Amersham Pharmacia
	10 mM	dCTP, Amersham Pharmacia
	10 mM	dGTP, Amersham Pharmacia
	10 mM	dTTP, Amersham Pharmacia

2.9.3 Materialien für die RT-PCR

OneStepRT-PCR Kit Qiagen

Nähere Angaben zu Pufferzusammensetzung/Enzymen sind dem Methodenteil, s. 3.3.6, zu entnehmen.

2.9.4 Reinigung von PCR-Produkten

<i>NucleoSpin®Extract Kit</i> (Macherey und Nagel)	Kieselerde säulchen
Puffer NT2	M+N
Puffer NT3	M+N
Puffer NE	M+N

2.9.5 Klonierung (von PCR-Produkten)

<i>pGEM®-T-Vector System</i> (Promega)	<i>pGEM®-T-Vektor</i> 2x T4-DNA-Ligase-Puffer T4-DNA-Ligase
<i>TOPO TA Cloning®-Kit</i> (pCR 2.1)(Invitrogen)	<i>TOPO TA Cloning®-Vektor</i>
Salzlösung	1,2 M NaCl 0,06 M MgCl ₂

10x T4-DNA-Ligase-Puffer	300 mM	Tris-HCl pH 7,8
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	DTT
	10 mM	ATP

T4-DNA-Ligase Amersham Pharmacia Biotech

2.10 Markierung von DNA

2.10.1 Markierung von DNA mit Digoxigenin

<i>PCR DIG Probe Synthesis Mix</i>	2 mM	dATP
(Roche Molecular Biochemicals)	2 mM	dCTP
	2 mM	dGTP
	1,3 mM	dTTP
	0,7 mM	Alkali-labiles DIG-11-dUTP, pH 7,0

2.11 Analyse von DNA

2.11.1 DNA-Größenmarker

λ / <i>Hind</i> III	Gibco BRL
Φ -X174/ <i>Hae</i> III	Gibco BRL
SmartLadder	EUROGENTEC

2.11.2 Gelelektrophorese

0,7-2,5 %-ige Agarosegele	0,7-2,5 g	Agarose in 100 ml 1x TAE
	0,4 μ g/ml	Ethidiumbromid
Laufpuffer	1x TAE	
DNA-Probenpuffer	20 %	Ficoll
	0,5 %	Orange G
	20 mM	EDTA

2.11.3 Southern Blot-Analyse

Digoxigenin-Methode (Roche Molecular Biochemicals)

Hybridisierungslösung	<i>DIG Easy Hyb</i>	
Maleinsäurepuffer	0,1 M	Maleinsäure
	0,15 M	NaCl
	pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren	
Waschpuffer	Maleinsäurepuffer mit	
	0,3 % (w/v)	Tween-20
<i>Blocking</i> -Puffer	10-fache Verdünnung der <i>Blocking Reagent</i> -Stocklösung in Maleinsäurepuffer	
Detektionspuffer	100 mM	Tris-HCl pH 9,5
	100 mM	NaCl
Alkalische Phosphatase-konjugierte α -Digoxigenin-Fab Fragmente	Roche Molecular Biochemicals	
Nylon Membran, positiv geladen	Roche Molecular Biochemicals	
CSPD – gebrauchsfertig	Roche Molecular Biochemicals	

2.12 Nukleinsäuren

2.12.1 Vektoren und Cosmide

Cosmide:

E9-111 (pHD 999), D8-120 (pHD 883), A9-93 (pHD 882), A7-88, D5-70, enthalten Katalase genomische DNA, alle von J. Ajioka, Cambridge, UK

Vektoren

pBluescript KS II (+)/SK II (+)	Stratagene
<i>pGEM[®]-T-Vektor</i>	Promega
<i>pCR[®]2.1 -TOPO-Vektor</i> (<i>TOPO TA Cloning[®]-Vektor</i>)	Invitrogen
pminHXGPRT („Vektor 2855“)	Dr. D. Soldati, Imperial College, London
pTUB8/CAT	Dr. D. Soldati, Imperial College, London
pTUB8MycGFPPf.myotail dhfr ts HX	Dr. Christine Hettmann, ZMBH
pTUB8MycHisGFP-HXGPRT	Dr. Christine Hettmann, ZMBH
pTUB8MycGFPPf.myotailTy-1HX	Dr. Christine Hettmann, ZMBH

2.12.2 Oligonukleotide

Primer für die Klonierung/Amplifizierung/Sequenzierung

Primer cz	Sequenz 5'-3'	Merkmale
828	GGTGGCGGCCGCTCTAGAACT	<i>Sense primer</i> , zur DNA-Sondenherstellung für <i>Southern/Northern Blot</i> (enthält <i>pBluescript-Sequenzen</i>)
830	TCGCCGATGTGCCAATGAGC	<i>Antisense primer</i> , zur DNA-Sondenherstellung für <i>Southern/Northern Blot</i>
989	<u>GCCAAGATGTGATTAAT</u>	<i>Sense primer</i> , bildet mit cz990 ein AKM Hybrid (<i>PstI/PacI</i>)
990	<u>TAATCACATCTTGGCTGCA</u>	<i>Antisense primer</i> , bildet mit cz989 ein AKM Hybrid (<i>PstI/PacI</i>)
1005	<u>GGTTTGCCGACTGCGGCGTGCTACCCAGC</u> <u>CAAGATGTAGTTAAT</u>	<i>Sense primer</i> , bildet mit cz1006 9AS+AKM Hybrid (<i>PstI/PacI</i>)
1006	<u>TAACTACATCTTGGCTGGGTAGCACGCCG</u> <u>CAGTCGGCAAACCTGCA</u>	<i>Antisense primer</i> , bildet mit cz1005 9AS+AKM Hybrid (<i>PstI/PacI</i>)
1231	<u>TAAAAGCTTGCTCGGGCCTGCA</u>	<i>Antisense Primer</i> , bildet mit cz1232 GPSKL Hybrid (<i>PstI/PacI</i>)
1232	<u>GGCCCGAGCAAGCTTTAAT</u>	<i>Sense primer</i> , bildet mit cz1231 GPSKL Hybrid (<i>PstI/PacI</i>)
1242	<u>CAGGATCCGTTTCCCTGTTTGATGTTAGTC</u>	Katalase 3'-UTR <i>sense primer</i> mit <i>BamHI</i> Schnittstelle; für das Katalase- <i>k.o.</i> -Konstrukt Position 6529-6550
1243	<u>GGGCGGCCGCATTGGAACGTGAGGTAGG</u> CGAGGTG	Katalase 3'-UTR <i>antisense primer</i> mit <i>NoI</i> Schnittstelle; für das Katalase- <i>k.o.</i> -Konstrukt Position 9254-9278, 3' vom Stop-Codon
1268	<u>GGGGTACCTGGCTGTACGCTGGAGTTGAC</u> G	Katalase 5'-UTR <i>sense primer</i> mit <i>KpnI</i> Schnittstelle; für das Katalase- <i>k.o.</i> -Konstrukt Position (-)1784-(-)1763 5' vom Start-Codon
1269	<u>CCCAAGCTTCCCTTCGGGGTCAAAAACAG</u>	Katalase 5'-UTR <i>antisense primer</i> mit <i>HindIII</i> Schnittstelle; für das Katalase- <i>k.o.</i> -Konstrukt Position (-)25-(-)42, 5' vom Start-Codon

1517	TATCACAACCATGTTGGTCCTCGGC	<i>Sense primer</i> , um das <i>T. gondii</i> Pxn2 zu amplifizieren (mit Oligo 671 bzw. 1544); anschließende Klonierung in den <i>Topo</i> -Vektor für die Sequenzierung
1519	GGCCAATTGCCTTTTTTCGACAAAATGAC TCAGGTTCGCCCCG	<i>Sense primer</i> mit <i>Mfe</i> I Schnittstelle, um <i>T. gondii</i> Katalase cDNA zu amplifizieren
1520	CGGTTAATTA ACTACATCTTGGCTGGGTA GCACG	<i>Antisense primer</i> mit <i>Pac</i> I Schnittstelle, um <i>T. gondii</i> Katalase cDNA zu amplifizieren
1539	CCTTGAATTCCTTTTTTCGACAAAATGGCG GATGGAAGCTTTGGA	<i>Sense primer</i> mit <i>Eco</i> RI Schnittstelle, um <i>T. gondii</i> Pxn1 zu amplifizieren (mit cz1540)
1540	GGCCCTGCAGGCTTGCTTCGAGATACTCC TTAAC	<i>Antisense primer</i> mit <i>Pst</i> I Schnittstelle, um <i>T. gondii</i> Pxn1 zu amplifizieren (mit cz1539)
1544	CTCAAACCTGACACGCAGTGG	<i>Antisense primer</i> , um Pxn2 auf genomischer DNA zu amplifizieren (mit cz1517)
1555	TTTCATACCTGCAGGGCG	<i>Antisense primer</i> Sequenzierprimer Pxn2
1603	CCTTCAATTGCCTTTTTTCGACAAAATGTTGG TCCTCGGCAGCACG	<i>Sense primer</i> mit <i>Mfe</i> I Schnittstelle, um <i>T. gondii</i> Pxn2 zu amplifizieren (mit cz1604)
1604	GGCCATGCATGCGCCGACGGATCCGGAGCG TA	<i>Antisense primer</i> mit <i>Nsi</i> I Schnittstelle, um <i>T. gondii</i> Pxn1 zu amplifizieren (mit cz1603)
1605	GAGACTTAAACTAGCGTTGGATCAC	<i>Antisense primer</i> Sequenzierprimer Pxn2

Primer für die *T. gondii* Katalase-Cosmid Sequenzierung

829	GCTCATTGGCACATCGGCGA	<i>Sense primer</i> Position 5604-5624, reverses Komplement von 830, im Exon 8
861	AACGACCACAGTGAGTGGCAC	<i>Sense primer</i> Position 4856-4876, im Exon 7
862	TCAAGCGGGACAACGCACGCC	<i>Antisense primer</i> Position 6122-6102; das C am 3'-Ende ist Teil des Stop-Codons
869	GACTGCAGGTGTCGGCGTTTA	<i>Sense primer</i> Position 6480-6500; der <i>primer</i> liegt 3' vom Stop-Codon (6103)
873	TAAACGCCGACACCTGCAGTC	<i>Antisense primer</i> Position 6500-6480, reverses Komplement von 869
967	TACGCTTGACGTCCACATGTGC	<i>Sense primer</i> Position 3571-3593, im Intron 5
986	AAAAACGAATCACACGCCAACGAC	<i>Antisense primer</i> Position 3644-3621, im Intron 5

1003	TGCAGCGTGTTTCCCCCTTTTCAA	<i>Sense primer</i> Position 6788-6811, 3' vom Stop-Codon
1004	TGATTGGTTTCCTCCGCATTT	<i>Sense primer</i> Position 5515-5535, im Intron 7
1020	CCATTCTGAGAGTTTTGATGTATAACC	<i>Sense primer</i> Position 5477-5504, im Intron 7
1146	GATTCCTCCATCCTTCCGC	<i>Antisense primer</i> Position (-)171-(-)190, 5' vom Start-Codon
1236	ATTTCAATTTCCACAATC	<i>Antisense primer</i> Position (-)781-(-)798, 5' vom Start-Codon
1237	CCTAAGGGTGGAAGCCCGT	<i>Sense primer</i> Position 7072-7090, 3' vom Stop-Codon
1244	CGGGCTAAACGATGAAAC	<i>Antisense primer</i> Position (-)1254-(-)1271, 5' vom Start-Codon
1245	CTCTTTGAGACCATTTGATACAG	<i>Antisense primer</i> Position 3080-3058, im Intron 5
1246	CTCCAGACGTTTCGAGATG	<i>Antisense primer</i> Position 2533-2516, im Intron 4
1247	GTCGAGAAAAATGCACATAGCTGG	<i>Antisense primer</i> Position 2061-2038, im Intron 4
1248	GAGGCGATGTACCGACAGG	<i>Antisense primer</i> Position 1558-1540, im Intron 3
1249	GAAACGGTAACAACAGTTGGG	<i>Antisense primer</i> Position 975-955, im Intron 3
1250	ATTTGGCAGAGCCAACGTAGC	<i>Antisense primer</i> Position 364-344, im Intron 1
1251	GACGGTTGCCAGCGATCTCG	<i>Sense primer</i> Position 4062-4081, im Intron 6
1254	GGTTTTCAAGATCCACGAGA	<i>Antisense primer</i> Position 3046-3027, im Intron 5
1255	GCTTGTGAAAACGCCACTG	<i>Antisense primer</i> Position 5087-5068, im Intron 7
1256	GTATTTCTGAGCACCATTCGC	<i>Antisense primer</i> Position 4509-4489, im Intron 6
1257	GTCGGGCGCTGAAGACGCCG	<i>Antisense primer</i> Position 3971-3952, im Intron 6

Die unterstrichenen Sequenzen sind eingeführte Restriktionsstellen bzw. bei den Hybriden Teile davon.

Sonstige verwendete *primer*:

Oligo 671 (Oligo dT) von der Gruppe Soldati, für RT-PCR, mit *Bam*HI Schnittstelle:

5'-CGGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Ferner, für Sequenzierungen:

Oligo P30 A von der Gruppe Soldati: CAAGCCACAGCGGAACAA

Oligo 65 von der Gruppe Soldati:	GGCGATGCATAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTC
T3-primer	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7-primer	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG

Die Oligonukleotide wurden bei der AG Frank, ZMBH bzw. bei Sigma-ARK hergestellt; Sequenzierungen wurden bei der AG Frank, ZMBH bzw. bei der Firma Toplab, Martinsried, durchführt.

2.13 Präparation und Analyse von RNA

2.13.1 RNA-Größenmarker

RNA-Leiter	(0,16-1,77 kb)	Gibco BRL
	(0,24-9,49 kb)	Gibco BRL

2.13.2 Präparation von RNA aus *T. gondii*

TRIzol	Gibco BRL
<i>(Total RNA Isolation Reagent)</i>	
DEPC-H ₂ O	

2.13.3 Northern Blot-Analyse

DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC zu ddH ₂ O geben, über Nacht schütteln, autoklavieren
10x MOPS-Puffer	200 mM MOPS 50 mM NaAcetat pH 7,0 10 mM EDTA
RNA-Ladepuffer	0,1 mg/ml Bromphenolblau 50 % Glycerin
5 %i-ge Essigsäurelösung	50 ml Essigsäure ad 1000 ml DEPC-H ₂ O
Methylenblau-Lösung	0,04 % Methylenblau 0,5 M NaOAc pH 5,2

Die Rezepte für die Lösungen sind identisch mit 2.11.3; anstelle von H₂O wurde DEPC-H₂O verwendet.

2.14 Protein-Analyse

2.14.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford Färbereagenz		BioRad
Standard-Stammlösung	100 µg/ml	BSA in H ₂ O

2.14.2 TCA-Präzipitation

50 %-ige Trichloressigsäure- lösung (TCA-Lösung)	50 g	Trichloressigsäure ad 100 ml H ₂ O
1 M Tris-Lösung	1 M	Tris, pH 8,0
Natriumdesoxycholat	2 %	in H ₂ O

(bei der TCA-Fällung nach MINI-BEADBEATER™ verwendet)

2.14.3 Herstellung von Zell-Lysaten aus *T. gondii* mittels RIPA-Lysat

RIPA-Puffer	150 mM	NaCl
	1 %	Triton X-100
	0,5 %	DOC
	0,1 %	SDS
	50 mM	Tris pH 8
	1 mM	EDTA

2.14.4 Herstellung von Zell-Lysaten unter Verwendung von Triton X-100®PC

Puffer I, pH 7,0 , 50 mM Phosphatpuffer, bestehend aus einer Mischung von 50 mM K₂HPO₄, (8,709 g/1000 ml H₂O) und 50 mM KH₂PO₄ (6,81 g/1000 ml H₂O)

K ₂ HPO ₄	61,5 ml	di-Kaliumhydrogenphosphat, Riedel-de Haën
KH ₂ PO ₄	38,5 ml	Kaliumdihydrogenphosphat, AppliChem, Darmstadt
Triton X-100-PC (0,1 % in Puffer I)		Sigma
1 Tablette/10 ml		<i>Complete Mini EDTA free</i> (Proteaseinhibitor) Roche Molecular Biochemicals

2.14.5 Fraktionierung von Toxoplasmen mit Digitonin

Digitoninlösung	1 mg	Digitonin (Sigma) in
	1 ml	Dimethylformamid (DMF, Sigma) lösen; jeweils vor Gebrauch durch Vortexen mischen
STE	250 mM	Saccharose
	25 mM	Tris/HCl pH 7,4
	1 mM	EDTA
STEN		STE mit
	150 mM	NaCl
PMSF	2 mg/ml	PMSF, in H ₂ O, in STEN 0,1 mM bzw.
1 Tablette/10 ml		<i>Complete Mini</i> (Proteaseinhibitor) Roche Molecular Biochemicals

2.14.6 Aufbrechen von Toxoplasmen mit Glaskugeln (*glass beads*)

Toxoplasmen-	25 mM	Tris-HCl pH 7,8
Homogenisierungspuffer	1 mM	EDTA
(THB)	10 %	Saccharose
	1 Tablette/10 ml	<i>Complete Mini</i> (Proteaseinhibitor) Roche Molecular Biochemicals
Glaskugeln	212-300 Microns	Sigma
MINI-BEADBEATER™		Biospec Products

2.14.7 Protein-Größenmarker

Größenstandards:

	10 kDa <i>Protein ladder</i>	Gibco BRL
BENCHMARK™	<i>Prestained Protein ladder</i>	Gibco BRL
	<i>Rainbow marker RPN756</i>	Amersham
	<i>Benchmark Protein ladder</i>	Invitrogen

2.14.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngele

Stocklösungen	Acrylamidkonzentrationen			
	7,5 %	10 %	12 %	15 %
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	2,5 ml	5 ml	4 ml	5 ml
4x Tris-Cl, pH 8,8	2,5 ml	3,75 ml	2,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	4,85 ml	6,25 ml	3,35 ml	2,35 ml
SDS 10 % (w/v)	100 µl	150 µl	100 µl	100 µl
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	60 µl	100 µl	60 µl	60 µl
TEMED	5 µl	10 µl	5 µl	5 µl

Sammelgel 3,9 %	1,25 ml	4x Tris-Cl, pH 6,8
	100 µl	10 % SDS
	0,65 ml	30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
	3 ml	H ₂ O
	50 µl	10 % APS
	5 µl	TEMED
10x Laufpuffer pH 8,3	30 g	Tris
	144 g	Glycin
	100 ml	10 % SDS
	ad 1000 ml H ₂ O	
5x Ladepuffer	250 mM	Tris-Cl pH 6,8
	10 %	SDS
	0,5 %	Bromphenolblau
	50 %	Glycerol

DTT wurde frisch hinzugegeben, aus einer 1 M Stocklösung, Endkonzentration 100 mM
 MINI-PROTEAN II (Gelapparatur) BIORAD

2.14.9 Anodisches diskontinuierliches Polyacrylamidgelelektrophoresesystem

Lösung	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	2 ml	1,2 ml
0,75 M Tris-Cl, pH 8,8	5 ml	-
0,125 M Tris-Cl, pH 6,8	-	5 ml
H ₂ O	2,9 ml	3,7 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

1x Laufpuffer pH 8,3	50 mM	Tris
	0,38 M	Glycin
Ladepuffer	60 µl	1x Laufpuffer pH 8,3
	40 µl	Glycerol 40 % + Bromphenolblau
		+
	60 µl	Probe in PBS bzw. PBS/0,2 % Triton mit <i>Complete Mini EDTA free</i> (Proteaseinhibitor) Roche Molecular Biochemicals
MINI-PROTEAN II (Gelapparatur)		BIORAD

2.14.10 Western Blot-Analyse

Magermilchpulver, Merck	5 %	in TBS-T
TBS-T	0,1 %	Tween-20 in TBS
Ponceau-Rot	0,02 %	Ponceau S in 3% Trichloressigsäure
<i>Stripping</i> -Puffer	100 mM	β-Mercaptoethanol
	2 %	SDS
	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,7
<i>ECL</i> -Reagenz		Amersham Pharmacia Biotech
<i>Hyperfilm-ECL</i>		Amersham Pharmacia Biotech
Nitrocellulosemembran		Schleicher und Schüll
Optitran BA-S 85		

2.14.11 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Fixierungslösungen	PBS/4 % Paraformaldehyd oder PBS/4 % Paraformaldehyd /0,05 % Glutaraldehyd oder Methanol (-80°C)
Neutralisierungslösung	PBS/0,1 M Glycin
Permeabilisierungslösung	PBS/0,2 % Triton X-100
Blockierungslösung	PBS/0,2 % Triton X-100/2 % BSA
DAPI	0,1 µg/ml in PBS

2.14.12 Aufreinigung von Seren

Affi-Gel® 15 Gel	2 ml	Biorad
Kopplungspuffer	50 mM	Hepes, pH 5
Blockierungspuffer	50 mM	Tris/50 mM Hepes, pH 7,2

Eluierungspuffer	0,1 M	Glycin (in H ₂ O), pH 2,5
Neutralisierungswaschpuffer	100 mM	Tris, pH 8
Waschpuffer	1x	TBS
Neutralisierungslösung	1 M	Tris, pH 8
TBS 10x zur Verdünnung der Antikörper		
Eventuell BSA zur Stabilisierung der Antikörper (1 %)		
Bio Rad®Bio Spin® chromatography column		

2.15 Enzym-assays

2.15.1 Enzymatische Messung der Katalase-Aktivität

Für die Probenbereitung wurden die Lösungen wie unter 2.14.4 benötigt.

Wasserstoffperoxid (30 %-ig)

Puffer II	PufferI + ca. 60 µl Wasserstoffperoxid
Katalase aus Rinderleber	Böhringer

2.15.2 Enzymatische Messung der Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivität

Für die Probenbereitung wurden die Lösungen wie unter 2.14.4 benötigt.

Prämix:	780 µl	100 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6
	25 µl	NADPH 6 mM reduziert, Biomol
	50 µl	Glutathion 20 mM reduziert, Böhringer
humane Glutathion-Reduktase	5 µl	15 U/ ml
Cumolhydroperoxid (80 %-ig)	3 µl	6 mM

2.16 Behandlung der Zellen mit Peroxid

2.16.1 Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid

H₂O₂ in DMEM mit Glutamin, jedoch ohne FCS (DMEM FCS⁻), in folgenden Molaritäten: 10⁻² M, 10⁻³ M, 10⁻⁴ M, 5x10⁻⁵ M, 10⁻⁵ M H₂O₂; 30 %-ige Wasserstoffperoxidlösung ist 8,82 M.

2.17 Untersuchung der Katalase-defizienten Toxoplasmen im Mäusemodell

2.17.1 *in vivo* Virulenztest

C57BL/6 Mäuse, 8 Wochen alt, Weibchen

HBSS	Gibco
Trypan Blau Lösung, 0,4 %	Sigma

2.18 Zellkulturmaterial

2.18.1 Zellkulturmedium für die Kultivierung von *T.gondii* und Wirtszellen

Antibiotikastammlösung (Gentamycin)	10 mg/ml	in H ₂ O
--	----------	---------------------

Zellkulturmedium Dulbecco's MEM (DMEM):

	2,2 g/l	Na-Bicarbonat
+	1 %	Glutamin
+	5-10 %	FCS
+	20 µg/ml	Gentamycin

2.18.2 Wirtszellen

Vero-Zellen	s. 3.11.2
HFF-Zellen	s. 3.11.2

2.18.3 Passagieren der Wirtszellen

Trypsin/EDTA	0,05 %	Trypsin (2,5 % Stocklösung)
	0,02 %	EDTA
	in 1x PBS	

2.18.4 Einfrieren und Auftauen von Parasiten

	25 %	FCS (Stock mit 50 %)
	10 %	DMSO
in DMEM mit den üblichen Zusätzen	(s. 2.8.1)	

2.18.5 Lösungen für die Transfektion und Selektion von *T. gondii*

Elektroporationspuffer (Cytomix)	120 mM	KCl
	0,15 mM	CaCl ₂
	10 mM	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6
	25 mM	Hepes, pH 7,6
	2 mM	EGTA, pH 7,6
	5 mM	MgCl ₂

eingestellt mit KOH auf pH 7,6

vor Gebrauch komplementieren mit

2 mM	ATP
3 mM	GSH (Endkonzentrationen)

Selektionslösungen:	25 µg/ml	Mycophenolsäure
	50 µg/ml	Xanthin

20 µM Chloramphenicol

bei allen Werten handelt es sich um die Endkonzentrationen im komplementierten DMEM.

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Bakterienkultur

Zum Wachstum auf LB-Agarplatten wurden die Bakterien mit einer Impföse ausgestrichen. Sie wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und konnten danach auf einer mit Parafilm umwickelten Platte über einen längeren Zeitraum bei 4°C aufbewahrt werden. Für das Wachstum größerer Mengen von Bakterien wurden Flüssigkulturen in LB-Medium angesetzt. Für die Selektion wurden dem flüssigen LB-Medium und den LB-Agarplatten die entsprechenden Antibiotika beigemischt.

3.1.2 Lagerung von Bakterien

0,5 ml einer Übernachtskultur wurden mit 0,5 ml LB-Medium/30 % Glycerin gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

3.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eingefrorene Bakterien-Zellen (in der Regel DH5 α -Zellen in Glycerin) wurden auf einer Ψ a-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 5 ml Ψ b-Medium angezüchtet. Die 5 ml-Kultur inkubierte man ca. 2 h bei 37°C und ließ die Bakterien bis zu einer OD₅₅₀ von 0,3 wachsen. Daraufhin wurde die 5 ml-Kultur in 100 ml Ψ b-Medium (auf 37°C vorgewärmt) überführt und die Bakterien bis zu einer OD₅₅₀ von 0,48 wachsen gelassen. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt und dann 5 min zentrifugiert. Die Zentrifugationsschritte wurden bei 6000 rpm und 4°C im Sorvall SS34-Rotor durchgeführt. Nachdem das zelluläre Pellet in 40 ml Tfb I-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis gekühlt worden war, folgten wiederum 5 min Zentrifugation. Die Zellen wurden in 4 ml Tfb II-Puffer aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden je 200 μ l der Zellsuspension in Eppendorfgläser aliquotiert, in Trockeneis eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Pro Transformationsansatz wurden 75 µl kompetente Zellen (in der Regel DH5α-Zellen) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5 µl des Ligationsansatzes folgten eine 10-minütige Inkubation auf Eis, ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec, nochmals 90 sec Inkubation auf Eis und schließlich die Zugabe von 200 µl Ψb-Medium. Dann wurde der Transformationsansatz 10 - 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden danach auf einer selektiven Agarplatte (100 µg Ampicillin/ml) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Wärmerraum inkubiert. Erfolgreich transformierte Zellen, die das Ampicillin-Resistenzgen trugen, bildeten in dieser Zeit Kolonien.

3.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA

3.2.1 Phenol-/Chloroform-Extraktion

Routinemethode zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus Lösungen von Nukleinsäuren und Proteinen. Phenol/Chloroform wurde im gleichen Volumen zugegeben. Nach kurzem Schütteln erfolgte eine ca. 3-minütige Zentrifugation bei 15000 rpm, RT. Die obere Phase wurde überführt, die untere verworfen.

3.2.2 Chloroformextraktion

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

3.2.3 Alkoholfällung von Nukleinsäuren

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

Eine DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) versetzt. Hinzu kam die 2,5-fache Menge an absolutem Ethanol. Nach kräftigem Schütteln wurde 15 min auf Trockeneis gefällt. Die Fällung zog eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm bei 4°C nach sich. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, 10 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und nach Entfernung des Alkohols für einige Minuten im *Speed Vac*-

Konzentrator getrocknet. Aufgenommen wurde es schließlich in einer adäquaten Menge TE, pH 8,0 mit RNase A (50 µg/ml), oder in H₂O.

3.2.4 Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration von DNA (OD-Messung)

Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, mißt man ihre Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀). Die Konzentration einer Lösung mit doppelsträngiger DNA berechnet sich nach folgender Formel:

$$(\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50) = \text{DNA-Konzentration (in mg/ml)}.$$

Berechnet man die Konzentration einer Lösung mit einzelsträngiger DNA (zum Beispiel die Konzentration von Primern), so verwendet man die Formel :

$$(\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 20) = \text{DNA-Konzentration (in mg/ml)}$$

Handelt es sich um längere, einzelsträngige DNA, so muss anstelle des Faktors 20 der Faktor 33 verwendet werden.

Das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Aufschluß darüber, wie rein die präparierte DNA tatsächlich ist. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 1,95, so ist die DNA-Lösung sehr rein und kann für weitere Experimente eingesetzt werden.

3.2.5 Methode zur schnellen Aufreinigung von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Von einer Übernachtskultur in LB-Medium (100 µg Ampicillin/ml) wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 30 sec zentrifugiert (RT, 13000 rpm, Tischzentrifuge). Die Bakterien wurden dann durch Vortexen in 150 µl Lösung 1 resuspendiert. Danach wurden 150 µl Lösung 2 zugegeben und der Inhalt durch mehrfaches Kippen sanft gemischt. Anschließend wurden 150 µl Lösung 3 zugegeben und der Inhalt durch Vortexen gemischt. Nach 10 min Zentrifugation (RT, 13000 rpm) wurde der Überstand in ein vorbereitetes Eppendorfgefäß überführt, im gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1/v:v) zugefügt und 5 sec durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde der Ansatz 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und präzipitiert (s. 3.2.3).

Sollte die DNA anschließend direkt sequenziert werden, so wurden Kieselerde-Säulchen von Macherey und Nagel verwendet, da sich DNA aufgrund ihrer Ladung über Anionenaustauscher-Chromatographie aufreinigen lässt. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer A1 resuspendiert, anschließend wurden 250 µl Puffer A2 dazugegeben und das Eppendorfgefäß mehrfach gekippt, um schließlich 300 µl Puffer A3 hinzuzufügen und das Gefäß mehrfach zu kippen. Die Lösung wurde bei RT 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert

und der Überstand auf eine Kieselerde-Säule überführt. Durch Zentrifugation (RT, 1 min, 13 000 rpm) wurde die Lösung über die Säule filtriert; die Säule wurde mit 600 µl Puffer A4 gewaschen und 1 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Um die Säule vollständig zu trocknen wurde 2 min zentrifugiert (RT, 13000 rpm). Die gebundene DNA wurde mit 50 µl AE-Puffer oder H₂O über einen 1-minütigen Inkubationsschritt und anschließender Zentrifugation (RT, 1 min, 13000 rpm) eluiert.

3.2.6 Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation)

Zur Aufreinigung größerer Mengen DNA wurden ebenfalls Kieselgel-Säulen (Qiagen) verwendet. Die Aufreinigung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Eine 200 ml-Übernachtskultur wurde 10 min bei 6000 rpm abzentrifugiert (Sorvall GS3-Rotor). Dieser und alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 10 ml Puffer P1 wurde der Ansatz zunächst in SS34-Röhrchen überführt. Daraufhin wurden 10 ml Puffer P2 zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 wurde der Ansatz sofort vorsichtig durchmischt und 20 min bei 18000 rpm (Sorvall SS34-Rotor) zentrifugiert. Nachdem eine Qiagen-Tip500-Säule mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war, wurde der Überstand auf die Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA gebunden wurde. Die Säule wurde anschließend mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und die DNA danach mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol, Mischen und anschließendem Zentrifugieren (40 min, 18000 rpm) wurde die DNA präzipitiert. Zuletzt folgte ein Waschschriff mit 5 ml 70 %-igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (20 min, 18000 rpm). Das Präzipitat wurde getrocknet (*Speed-Vac*-Konzentrator), in 500 µl TE-Puffer oder H₂O aufgenommen und bei – 20°C aufbewahrt.

3.2.7 Aufreinigung chromosomaler DNA aus *T. gondii*

Eine konfluent mit HFF bewachsene T₁₇₅-Flasche wurde mit *T. gondii* infiziert. Die nach etwa drei Tagen lysierenden Zellen (ca. 5 x 10⁸ Parasiten) wurden 15 min bei 1000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 µl 1 x PBS resuspendiert und erneut für 2 min zentrifugiert (RT, 13000 rpm). Das Sediment wurde in 40 µl PBS resuspendiert und 200 µl DNA-Lysepuffer mit 0.1 mg/ml RNase A zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde Proteinase K mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben und bei 56°C mind. 2 Stunden oder ÜN inkubiert. Danach wurde zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Der Überstand wurde anschließend zweimal mit Chloroform extrahiert. Aus dem Überstand wurde die genomische DNA mit eiskaltem Ethanol gefällt und danach mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in 200 µl TE vorsichtig resuspendiert.

3.3 Modifikation und Rekombination von DNA

3.3.1 Restriktion von DNA

Die Restriktionsenzyme wurden mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern verwendet. Pro μg Plasmid-DNA wurden 1-2 *Units* (U) Enzym, bei genomischer DNA bis zu 4 *Units* Enzym eingesetzt. Plasmid-DNA wurde mindestens eine Stunde, genomische DNA meist vier Stunden oder über Nacht bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur mit einem oder mehreren Enzymen inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug mindestens das 10-fache der Menge des eingesetzten Restriktionsenzym, da die Glycerin-Konzentration 5 % nicht überschreiten sollte (Restriktionsenzym-Lagerpuffer enthalten bis zu 50 % Glycerin). Hitzelabile Restriktionsenzyme konnten durch 10-minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert werden, hitzestabile Restriktionsenzyme dagegen wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Bei sofortigen Auftrag auf ein Agarosegel wurden die Enzyme zuvor nicht hitzeinaktiviert.

3.3.2 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase (CIP)

Um die Religation von Vektor-Fragmenten in einem Ligationsansatz zu vermeiden, wurden die 5'-Phosphate durch Alkalische Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, CIP) entfernt. Der Ansatz des Restriktionsverdau wurde direkt verwendet, indem man das Volumen durch CIP-Puffer (Endkonzentration 1x) und H₂O entsprechend vergrößerte. Pro Ansatz wurde mit 2 *Units* CIP 15 min bei 37°C inkubiert; ein weiterer Inkubationsschritt für 15 min bei 55°C schloß sich an, wofür erneut 3U CIP zugegeben wurden. Die so behandelte DNA wurde entweder direkt über ein Agarosegel aufgereinigt, oder das Enzym musste durch Phenol/Chloroform-Extraktion vollständig entfernt werden.

3.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Für die Ligation wurden dieselben molaren Mengen von Vektor-DNA und Fragment mit 1 μl Ligase-Puffer (10x), 1 μl T4-DNA-Ligase (5U/ μl) und H₂O in einem Volumen von 10 μl gemischt. Die Reaktion wurde mindestens 3 h bei RT oder ca. 16°C inkubiert. 5 μl dieser Lösung wurden in kompetente Bakterien transformiert (s. 3.1.4.).

3.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das DNA-Fragment wurde mit Hilfe eines Skalpell unter langwelligem UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß mit Loch überführt, in dem sich

Glaswolle befand und das in einem zweiten Eppendorfgefäß steckte. Durch 10 min Zentrifugation bei 10000 rpm (SS34-Rotor, Sorvall-Zentrifuge) wurde die DNA-haltige Flüssigkeit aus dem Gelstück in das untere Eppendorfgefäß transferiert, die Agarose hingegen durch die Glaswolle zurückgehalten. Die DNA-Lösung wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt, durch Vortexen gemischt und 5 min bei 13000 rpm, RT zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen transferiert, mit der gleichen Menge Chloroform vermischt und nach einem neuerlichen Zentrifugationsschritt wie unter 3.2.3. beschrieben gefällt und schließlich in einer geeigneten Menge TE aufgenommen.

Alternativ wurde für die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel das *QIAEX II Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen verwendet. Diese Methode basiert auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Matrix (hier Silikagel) zu binden. Das DNA-Fragment wurde mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel herausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß transferiert und das Gelstück gewogen. Anschließend wurde das dreifache Volumen des Gewichtes Puffer QX1 und je nach DNA-Menge 10-30 µl *QIAEX II Suspension* dazugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 50°C inkubiert, dabei alle 2 min gevortext. Die Agarose schmolz, und die darin enthaltene DNA blieb an der Silikamatrix haften. Die Lösung wurde 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit je 500 µl Puffer QX1 (1x) und Puffer PE (2x) gewaschen. Die DNA wurde 10-15 min luftgetrocknet und mit 20 µl H₂O eluiert. Hierzu wurden 20 µl H₂O dazupipettiert, gevortext, 5 min bei RT inkubiert, 30 sec abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch PCR können geringe Mengen DNA amplifiziert werden. Für eine Reaktion wurden 2-100 ng DNA als Matrize, 5 µl 10 x DNA-Polymerase-Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs 10 mM, je 5 µl der beiden Primer (20 µM) und 0,5 µl DNA-Polymerase (5U/µl) gemischt und mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und kurz zentrifugiert.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurde die DNA 7 min bei 95°C aufgeschmolzen. Es folgten 25-35 Zyklen, in denen Aufschmelzen der DNA (1 min, 95°C), Hybridisieren der Primer (ca. 1 min bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur) und Polymerisation (1-3 min, 72°C) wiederholt wurden. Im Anschluß an den letzten Zyklus erfolgte eine 7-minütige Polymerisation bei 72°C. Die Hybridisierungstemperatur und -länge wurde je nach Länge und Zusammensetzung der eingesetzten Primer und des Amplifikats berechnet. Wurde genomische DNA als Matrize benutzt, so begann die PCR mit einem 15-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C. Um die PCR zu verbessern, wurden folgende Zusätze bei Bedarf zugegeben:

Betain, Endkonzentration 1 M, um Sekundärstrukturen zu entfernen, bzw. DMSO, mit einem Anteil von 2.5 % vom Gesamtansatz, wodurch die Spezifität der Reaktion erhöht wurde.

Nach der Reaktion wurden 5 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel überprüft, der Rest mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert.

Alternativ wurde die PCR mit dem *NucleoSpin®Extract Kit* der Firma Macherey und Nagel gereinigt. Hierzu wurde die PCR-Reaktion mit TE-Puffer auf mindestens 50 µl aufgefüllt und das vorhandene Volumen mit 4 Volumen Puffer NT2 gemischt und auf eine Kieselerde-Säule geladen. Es schloß sich ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13000 rpm an (alle Schritte bei RT). Dann wurden 600 µl Puffer NT3 auf die Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und, um NT3 vollständig zu entfernen, nochmals 200 µl NT3 zugegeben und für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 50 µl Puffer NE bzw. H₂O auf die Säule pipettiert, 1 min inkubiert und dann für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die DNA somit eluiert. Die amplifizierte DNA konnte dann mit Restriktionsenzymen verdaut und kloniert werden. Die PCR kann auch mit Pfu- oder Vent-DNA-Polymerase durchgeführt werden, die eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (zum "Korrekturlesen") besitzen, deshalb weniger Fehler als die Taq-DNA-Polymerase verursachen und den Vorteil bieten, dass wirklich stumpfe Enden entstehen (Taq-Polymerase erzeugt A-Überhänge). Die von der Taq-Polymerase erzeugten A-Überhänge konnten für eine Klonierung des in der PCR erzeugten Fragmentes in den *TOPO TA Cloning®-Vektor* von Invitrogen genutzt werden, der die komplementären T-Überhänge besitzt (wahlweise auch der *pGEM®-T-Vektor* von Promega). Hierzu wurden 0,5 bis 4 µl des gereinigten oder ungereinigten PCR Produktes, 1 µl der im *Kit* enthaltenen Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) und steriles Wasser für ein Endvolumen von 5 µl gemischt, anschließend wurde 1 µl des *TOPO TA Cloning®-Vektors* hinzugefügt und das ganze 5 min bei RT inkubiert. 2 µl des Ligationsansatzes wurden für eine Transformation mit 75 µl DH5α verwendet. Diese Klonierung wurde bevorzugt dann angewendet, wenn das PCR-Fragment sequenziert werden oder wenn es an den Enden geschnitten werden sollte, was durch das Hineinklonieren in den *TOPO TA Cloning®-Vektor* und anschließendes Herausschneiden sichtbar gemacht werden konnte.

3.3.6 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei den Reversen Transkriptasen handelt es sich um RNA-abhängige DNA-Polymerasen. Sie verwenden einzelsträngige RNA als Matrize und stellen hiervon eine doppelsträngige DNA Kopie her. Sie sind Bestandteil aller RNA Tumroviren und benötigen einen kurzen doppelsträngigen Nukleinsäurebereich, an dem die Synthese beginnen kann. Unter natürlichen Bedingungen wird dieser *primer* durch eine tRNA gebildet. Verwendet wurde das *OneStepRT-PCR Kit* von Quiagen, bei der sowohl die reverse Transkription als auch die PCR im selben Reaktionsgefäß ablaufen. Folgende Reagenzien wurden in einem Gefäß gemischt: 10 µl 5x Quiagen *OneStep RT-PCR* Puffer (enthält Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 12,5 mM

MgCl₂, DTT, pH 8,7 (20°C)); 2 µl dNTP Mix (10 mM); je 3 µl *sense* bzw. *antisense primer* (10 µM); 2 µl Quiagen *OneStep RT-PCR Enzyme Mix (Omniscript Reverse TranscriptaseTM, Sensiscript Reverse TranscriptaseTM und HotStarTaq DNA PolymeraseTM)*, bei allen dreien handelt es sich um rekombinante Proteine, die in *E. coli* hergestellt wurden, in Lagerungspuffer: 20 mM Tris-Cl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Nonidet® P-40, 0,5 % (v/v) Tween® 20, 50 % (v/v) Glycerol, Stabilisator; pH 9,0 (20°C); 0,25 µl RNase Inhibitor (40 U/µl); 1,25 µl DMSO; 10 µl Betain 5 M sowie 17,5 µl H₂O und 1 µl (1 µg/µl) *T. gondii* Gesamt-RNA. Es folgte ein kurzer Zentrifugationsschritt, um den Inhalt des Gefäßes am Boden zu sammeln. Anschließend wurde das Gefäß 30 min bei 50°C inkubiert, bei dieser Temperatur fand die Reverse Transkription mit den beiden Enzymen *Omniscript* und *Sensiscript Reverse Transcriptase* statt. Bei dieser Temperatur ist die ebenfalls im Enzymgemisch enthaltene *HotStarTaq DNA Polymerase* inaktiv. Durch das anschließende Erhitzen der Reaktion für 15 min bei 95°C wurden die beiden Reversen Transkriptasen inaktiviert, wohingegen die *HotStarTaq DNA Polymerase* aktiviert wurde. Es schlossen sich 30 Cyclen an, in denen Aufschmelzen der DNA (1 min, 95°C), Hybridisieren der Primer (ca. 1 min 30 s bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur) und Polymerisation (1 min 30 s, 72°C) wiederholt wurden. Es folgte ein 7-minütiger Zyklus bei 72°C, um die Polymerisation zu beenden. Anschließend wurden 5 µl der Reaktion auf einem Agarosegel überprüft und der Rest des Ansatzes direkt für eine Klonierung verwendet oder aufgereinigt mit dem *NucleoSpin®Extract Kit* von Macherey und Nagel (s. 3.3.5).

3.4 Markierung von DNA

3.4.1 Markierung mit Digoxigenin

(*Digoxigenin PCR Probe Synthesis System* von Roche Biochemicals)

Zur Digoxigenin-Markierung von DNA wurde durch PCR das entsprechende DNA-Fragment in Anwesenheit von Digoxigenin-markiertem dUTP durchgeführt. Es wurden 5 µl 10x Taq-Puffer, 5 µl Digoxigenin *PCR Probe Synthese-Mix*, je 2,5 µl der *primer* (20 µM) und 1,25 µl Taq-Polymerase mit der Matrize und H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Das PCR-Programm richtete sich nach dem jeweiligen Amplifikat. Ausbeute und Reinheit des Amplifikats wurde durch die Analyse von 5 µl des Produktes auf einem Agarose-Gel überprüft. Zur Kontrolle wurde eine äquivalente PCR mit unmarkierten Nukleotiden durchgeführt. Da hier die Digoxigenin-Markierung fehlte, lief das unmarkierte Produkt in der Gelelektrophorese etwas schneller.

3.5 Analyse von DNA

3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele können sowohl zur Analyse von Plasmid- als auch von genomischer DNA verwendet werden. Die Agarosekonzentration richtet sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente. Für große DNA-Fragmente (1-10kb) wird eine Konzentration von 0,7 % Agarose, für kleine Fragmente (0,1-1 kb) eine Agarosekonzentration von 1 - 2,5 % verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Agarosemenge in 100 ml 1x TAE aufgeköcht, mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in den Gelschlitten gegossen. Zu den Proben wurden 1/5 Volumen Auftragspuffer 5x pipettiert und die Elektrophorese in einer Flachgelapparatur bei 18 V (über Nacht) bis 120 V (1 h) in 1x TAE-Puffer durchgeführt.

3.5.2 Sequenzierung von DNA

Sämtliche Sequenzierungen wurden bei der Firma Toplab, Martinsried, bzw. im ZMBH, AG Frank, durchgeführt.

3.5.3 *Southern Blot*

5 µg genomische DNA wurden mit einem geeigneten Restriktionsenzym mindestens vier Stunden oder über Nacht verdaut und auf einem 0,8 %-igen Agarosegel bei 18 V (über Nacht) bis 60 V (ca. sechs Stunden) aufgetrennt (Marker siehe 2.11.1). Das Gel wurde neben einem Lineal photographiert und dann 15 min in 0,25 M HCl bei RT geschüttelt; durch diese Säurebehandlung wurde die DNA partiell depuriniert und hydrolysiert, was den Transfer von großen Fragmenten auf die Membran erleichterte. Dann wurde das Gel kurz in H₂O gewaschen, 30 min bei RT in Denaturierungslösung geschüttelt, wieder kurz in H₂O gewaschen und schließlich zweimal 15 min bei RT in Neutralisierungslösung geschüttelt. Danach wurde das Gel auf *Blotting*-Papier positioniert, das in einem Tablett über einen umgekehrten Gelschlitten gelegt wurde und dessen Enden in den Transferpuffer 10 x SSC hingen. Nachdem unter alle Seiten des Gels Parafilmstreifen gelegt worden waren, folgten auf das Gel eine Nylonmembran (*Hybond-N+*), die mit einer Pipette ausgerollt wurde, um Luftblasen zu vermeiden, ein Stück *Blotting*-Papier und ein Stapel Zellstoff, der mit einem Gewicht beschwert wurde. Dieser *Kapillar-Blot* wurde mindestens sechs Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die DNA im UV-*Crosslinker* kovalent an die Membran gebunden (120 mJ).

3.5.4 Southern Blot-Analyse

Die Membran des *Southern Blot* wurde in 20 ml *DIG Easy Hyb*-Lösung (filtriert und auf 42°C vorgewärmt) mindestens 2 h prähybridisiert. Diese Lösung wurde dann durch 20 ml Hybridisierungslösung ersetzt (filtrierte und vorgewärmte *DIG Easy Hyb*-Lösung mit 7,5 µl Digoxigenin-markierter Sonde) und über Nacht bei 42°C hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde die Hybridisierungslösung abgegossen (diese Lösung kann mehrmals wiederverwendet werden; sie wurde bei -20°C gelagert und vor der nächsten Verwendung 10 min bei 68°C denaturiert) und die Membran zweimal 5 min mit 2x SSC/0,1 % SDS bei RT gewaschen. Es folgten zwei Waschschrte in 0,5x SSC/0,1 % SDS bei 68°C. Die Membran wurde in einem neuen Gefäß 1 min in Waschpuffer äquilibriert und dann in 1 % *Blocking*-Puffer 1h bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 30 min in 1 % *Blocking*-Puffer, in der Alkalische Phosphatase-gekoppelter Antikörper gegen Digoxigenin 1:10000 verdünnt wurde, inkubiert, und zweimal 15 min bei RT in Waschpuffer gewaschen. Nachdem man die Membran 2 min in der Detektionslösung äquilibriert hatte, wurde sie auf eine stabile Folie (ausgeschnitten aus einem Rundbodenbeutel) überführt und mit 1 ml gleichmäßig auf der Membran verteiltem CSPD 5 min bei RT inkubiert. Die Membran wurde in einen aufgeschnittenen Rundbodenbeutel überführt und in einer Expositionskassette 15 min bei 37°C inkubiert, um das Plateau des Emissionsmaximums der enzymatischen Detektionsreaktion schneller zu erreichen. Die erste Exposition eines Röntgenfilmes dauert bei RT ca. 40 min und wurde dann dem Signal entsprechend variiert.

3.6 Präparation und Analyse von RNA

Das für RNA benötigte Wasser wurde zur Inaktivierung von RNasen vor Gebrauch mit DEPC behandelt; das verwendete Plastikmaterial musste ebenfalls RNase-frei und steril sein. Zur RNA-Isolation wurden die frisch lysierenden Parasiten mindestens einer 175 cm² Flasche mit Veros verwendet.

3.6.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *T. gondii*

Die Zellen wurden 10 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer sterilen Glaspipette abgenommen, das Pellet in 1 ml TRIzol resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml-Schraubdeckelgefäß überführt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugefügt, 15 sec kräftig geschüttelt und 2-3 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben bei 10000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde in ein neues Schraubdeckelgefäß überführt und die RNA durch Mischen mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Proben bei 10000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert; das Pellet wurde mit 1 ml

75 %-igem Ethanol gewaschen. Die Proben wurden 5 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert und die RNA anschließend im geöffneten Gefäß, durch ein Tuch bedeckt, getrocknet. Es folgte eine Aufnahme in 30 µl DEPC H₂O und ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei 55°C, anschließend wurde die RNA bei –80°C aufbewahrt.

3.6.2 Auftrennung von RNA im denaturierenden Formaldehydgel

1,2 g Agarose wurden in 81 ml H₂O in einem sterilen Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen wurden 11 ml 10x MOPS-Puffer und 20 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen.

Die RNA-Proben wurden folgendermaßen denaturiert: Maximal 4,5 µl (10 µg) Gesamt-RNA wurden mit 1 µl 10x MOPS, 3,5 µl Formaldehyd, 10 µl Formamid, 1 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und 15 min auf 65°C erhitzt. Die Proben wurden auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1 µl RNA-Auftragspuffer ca. 5 h bei 60 V in dem oben beschriebenen 1 %-igen Formaldehydgel aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS-Puffer verwendet, Marker siehe 2.13.1.

3.6.3 Northern Blot

Nach der Gelelektrophorese wurde das Formaldehydgel neben einem Lineal photographiert, direkt auf das *Blotting*-Papier gelegt, und mindestens vier Stunden ein Kapillar-*Blot* auf eine Nylonmembran (*Hybond-N*) durchgeführt wie für *Southern Blot* in 3.5.3. beschrieben. Anschließend wurde die RNA im UV-*Crosslinker* (120 mJ) kovalent an die Membran gebunden. Es schloß sich eine Methylenblau Färbung der RNA an: Die Membran wurde in 5 % Essigsäure für 15 min inkubiert, anschließend die Methylenblau Lösung für 10 min zugegeben. Dann wurde mit DEPC Wasser gewaschen und der Marker eingezeichnet.

3.6.4 Northern Blot-Analyse

Die *Northern Blot*-Analyse entspricht der unter 3.5.4 beschriebenen *Southern Blot*-Analyse, wobei für die Herstellung der Lösungen DEPC H₂O verwendet wurde. Es wurde auch die unter 3.4.1 beschriebene Digoxigenin-markierte DNA-Sonde eingesetzt.

3.7 Protein-Analyse

3.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde mit Hilfe von Bradford-Reagenz bestimmt (Bradford, 1976). Hierzu wurden 1 - 10 µl Probe mit Wasser auf ein Endvolumen von 800 µl gebracht, mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und gevortext. Die Extinktion dieser Lösung wurde im Photometer bei 550 nm gemessen und anhand einer Eichgeraden mit BSA die Konzentration ermittelt.

3.7.2 TCA-Präzipitation

Um Proteinlösungen auf ein kleineres Volumen einzuengen, wurden sie mit 7-10 % fünfzig %-iger (w/v) TCA-Lösung versetzt, durch Vortexen gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei 60°C. Danach wurde der Ansatz 10 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Proteinpellet mit Aceton gewaschen, dann nochmals 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, kurz trocknen gelassen und in Probenpuffer aufgenommen. Gegebenenfalls wurde durch Zugabe von wenigen Mikrolitern 1 M Tris-Lösung (pH 8,0) der pH-Wert der Lösung neutralisiert.

3.7.3 Herstellung eines Gesamtzellextraktes für die Proteinanalyse

Der Inhalt einer frisch durch die Parasiten lysierten 25 cm² Vero-Zellen Kultur-Flasche wurde bei 1200 rpm für 10 min bei 4°C in einem Röhrchen zentrifugiert und das resultierende Pellet in ca. 5 ml kalten PBS resuspendiert. Nach einem weiteren 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm, 4°C wurde das Pellet in 1x Probenpuffer aufgenommen, gevortext, bei 95°C 5 min denaturiert, gevortext, kurz zentrifugiert und anschließend in adäquaten Mengen auf ein Proteingel geladen oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.7.4 Herstellung von Zell-Lysaten aus *T. gondii* mittels RIPA-Lysat

Alternativ zu der unter 3.7.3 beschriebenen Methode wurde auch detergentzhaltiger RIPA-Puffer verwendet. Nach dem Waschschrift mit PBS und anschließender Zentrifugation wurden 50 - 100 µl RIPA-Lysat zum Pellet gegeben und resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Vortexen des Ansatzes folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C für 15 min bei 13000 rpm. Der resultierende Überstand wurde bei -20°C aufbewahrt und konnte für den Auftrag auf Proteingele mit der adäquaten Menge Probenpuffer versetzt

werden. Vorteil dieser Methode ist das keine störende DNA den Lauf der Proteine im Proteingel beeinflusst.

3.7.5 Herstellung von Zell-Lysaten unter Verwendung von Triton X-100® PC

Für die Ermittlung der Enzymaktivitäten von *T. gondii* Proteinen wurde der Inhalt einer frisch durch die Parasiten lysierten 25 cm² Vero Kultur-Flasche bei 4°C für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 5 ml kaltem PBS resuspendiert und nochmals bei 4°C für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl kaltem Kaliumphosphatpuffer, pH 7 (Puffer I), der 0,1 % Triton X-100 (Peroxid-frei) sowie Proteaseinhibitoren (EDTA-frei) enthielt, resuspendiert und für 10 – 20 min unter gelegentlichem vortexen auf Eis inkubiert. Es schloß sich ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm, 4°C, für 15 min an. Der so gewonnene Überstand wurde bei 4°C gelagert, die Proteinkonzentration bestimmt und das Lysat so zügig wie möglich verwendet.

3.7.6 Fraktionierung von Toxoplasmen mit Digitonin

Diese Methode der Zellfraktionierung beruht auf der Permeabilisierungseigenschaft von Digitonin abhängig vom Cholesteringehalt einer Membran: Plasmamembranen werden aufgrund ihres höheren Cholesteringehalts durch bestimmte Digitoninkonzentrationen permeabilisiert, bei denen die Membranen von Organellen noch intakt bleiben. Dies sollte die Fraktionierung von Toxoplasmen in eine zytosolische und eine grobe peroxisomale Fraktion erlauben.

Der Inhalt einer frisch durch die Parasiten lysierten 25 cm² Vero Kultur-Flasche wurde 10 min bei 4 °C und 2000 rpm abzentrifugiert. Es schloß sich ein Waschschrift mit kaltem PBS und eine weitere Zentrifugation an. Die Zellen wurden mit ca. 5 ml eiskaltem STE gewaschen und nochmals 10 min bei 4°C und 2000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl eiskaltem STEN mit Proteaseinhibitoren (0,1 mM PMSF) gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und der Proteingehalt der Lösung mittels einer Bradford-Proteinbestimmung ermittelt. Die 10 µg Gesamtprotein entsprechende Menge wurde mit STEN, das auf 25°C prääquilibriert wurde, auf 98 µl aufgefüllt und mit 2 µl Digitoninlösung (Digitonin in Dimethylformamid, DMF) versetzt. Verwendet wurden verschiedene Ausgangskonzentrationen, z. B. 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 und 0,5 mg Digitonin pro ml DMF. Die Lösung wurde 5 sec gevortext, 4 min bei 25°C inkubiert und dann 2 min bei 20000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde direkt in 2x Probenpuffer aufgenommen, der zuvor abgenommene Überstand wurde mit STEN auf 1 ml aufgefüllt und anschließend TCA präzipitiert. Das so gewonnene Pellet wurde direkt in 15 µl 2x Probenpuffer aufgenommen.

3.7.7 Fraktionierung von Zellen durch Sonifizierung (für die native PAGE)

Eine Möglichkeit, Zellen mechanisch aufzubrechen, ist die Sonifizierung. Die Pellets wurden nach dem Waschschrift in zwei Hälften geteilt und in kaltem PBS (ca. 150 µl) bzw. PBS/0,2 % Triton X-100 (um den Aufbruch der Zellen sicherzustellen), das Proteaseinhibitoren enthielt, aufgenommen. Es handelte sich um ein *T. gondii* RH Tachyzoiten Pellet aus einer 75 cm² Kulturflasche mit frisch lysierten Vero-Zellen, die Hälfte davon wurde hierfür verwendet; als negative Kontrolle wurde ein 25 cm² Vero Fläschchen trypsiniert und das ganze Pellet verwendet. Man hatte also 4 Röhrchen zu je 150 µl, die Proben je einmal in PBS bzw. PBS/0,2% Triton. Anschließend erfolgte die Sonifikation. Die Röhrchen befanden sich bei diesem Sonifikator (Cuphorn) in einem Eisbad, es wurde bei Stufe 6 für 75 Sekunden, 30 % *pulse*, sonifiziert. Es schloß sich ein Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm, 4°C, für 15 min an, der resultierende Überstand betrug ca. 150 µl. Die Proben sollten einerseits auf native Gele, andererseits zur Kontrolle auch auf SDS-Gele geladen werden.

Für die nativen Gele wurden je 60 µl des 150 µl Überstandes mit 60 µl des nativen Ladepuffers versetzt und 40 µl 40 % Glycerol (+ Bromphenolblau) zugegeben. Je 30 µl dieser Mischung wurden pro Spur im Gel geladen (je vier Spuren waren je Ansatz zu beladen, = 120 µl)

Für die SDS Gele wurden je 60 µl des 150 µl Überstandes mit 68 µl H₂O, 16 µl 1M DTT sowie 16 µl 10x Probenpuffer gemischt und ebenfalls je 30 µl dieser Mischung pro Spur im Gel geladen (je vier Spuren waren zu beladen, = 120 µl).

Somit sollte in jeder Spur die gleiche Menge Protein geladen sein.

3.7.8 Aufbrechen von Zellen durch wiederholtes Schockgefrieren und Auftauen

Auch mit dieser Methode wurden die Zellen mechanisch aufgebrochen. Nach dem Waschen des Toxoplasmenpellets und anschließender Zentrifugation wurde das Pellet in kaltem PBS aufgenommen, das mit Proteaseinhibitoren (*Complete Mini*) versetzt worden war, und in ein Tisch-Ultrazentrifugenröhrchen transferiert. Anschließend wurde das Röhrchen in flüssigen Stickstoff gegeben, bis der Inhalt komplett gefroren war, und bei 37°C solange inkubiert, bis der Inhalt wieder aufgetaut war. Dieser Vorgang wurde 3x wiederholt. Es folgte die Ultrazentrifugation s. 3.7.10.

3.7.9 Aufbrechen von Toxoplasmen mit Glaskugeln (*glass beads*)

Eine weitere Methode, die Zellen mechanisch aufzubrechen, ist der Aufbruch mit *glass beads*. Eine frisch lysierte Vero Kulturschale (150x20 mm) mit Toxoplasmen wurde 10 min bei 4°C und 1200 rpm pelletiert, mit eiskaltem THB-Puffer und Proteaseinhibitoren (2 µg/ml Leupeptin) gewaschen und 1 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert (1 min beschädigt

die Parasiten nicht). Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem THB aufgenommen und in ein spezielles 2 ml Reaktionsgefäß transferiert, welches zur Hälfte mit Glaskugeln befüllt war; dann wurde ca. zehnmal für 5 sec (bis der Aufbruch der Zellen unter dem Mikroskop sichtbar war) auf dem MINI-BEADBEATER™ auf höchster Stufe vibriert. Zwischen den Vibrationsintervallen wurde das Röhrchen kurz auf Eis gekühlt, um eine Überhitzung der Lösung zu vermeiden. Nachdem sich die Glaskugeln abgesetzt hatten (nach ca. 1 min) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Glaskugeln mit 200 µl THB versetzt, gemischt, absetzen gelassen und wiederum in das neue Gefäß überführt. Das so gewonnene Homogenat mit den aufgebrochenen Toxoplasmen wurde 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, um größere Zellbestandteile (Zellkerne, große mitochondrielle Fragmente, intakte Zellen) zu sedimentieren. Der resultierende Überstand (PN) wurde erneut in ein frisches Eppendorfgefäß transferiert und 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, um alle festen Zellbestandteile zu pelletieren. Das hierbei gewonnene organelläre Pellet wurde in 200 µl THB aufgenommen. Das resuspendierte Pellet wurde auf einen geschichteten (70 % Saccharose am Boden des Röhrchens, in 10er Schritten bis zu 30 % Saccharose an der Spitze des Röhrchens; Saccharose in 25 mM Tris, 1 mM EDTA) Saccharosegradienten geladen und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

3.7.10 Fraktionierung von Zellhomogenaten mittels anschließendem Ultrazentrifugationsschritt

Die durch Schockgefrieren gewonnenen Homogenate aus Punkt 3.7.8 wurden in der Beckmann-Tischzentrifuge TL-100 (Rotor TLA-45) für 45 min bei 45000 rpm, 4°C, zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde direkt in 2x Probenpuffer aufgenommen, der Überstand wurde TCA präzipitiert und ebenfalls in 2x Probenpuffer aufgenommen.

Die durch Glaskugeln aus Punkt 3.7.9 gewonnenen Homogenate wurden, wie schon erwähnt, auf einen geschichteten, bei 4°C gelagerten Saccharose-Gradienten geladen und bei 45000 rpm für 45 min bei 4°C in der Beckmann L8-70M Ultrazentrifuge (Rotor SW60) zentrifugiert. Der Gradient wurde in kreisenden Bewegungen von unten nach oben in 330 µl Schritten abgenommen und TCA präzipitiert. Die entstehenden Pellets wurden in 20 µl 2x Probenpuffer aufgenommen und die Hälfte davon auf ein Gel geladen.

3.7.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Die Proben wurden auf 1x Endvolumen mit Probenpuffer versetzt, gevortext, bei 95°C 5 min denaturiert, gevortext, kurz zentrifugiert und auf das SDS-Polyacrylamidgel (3,9 %-iges Sammelgel, 7,5 - 15 %-iges Trenngel) aufgetragen und bei konstant 200 Volt ca. 45 min in einer MINI

PROTEAN II ZELLE aufgetrennt. Die Größenmarker sind dem Material Teil zu entnehmen, s. 2.14.7.

3.7.12 Anodisches diskontinuierliches Polyacrylamidgelelektrophoresesystem

(Native PAGE)

Dieses System ist für neutrale oder saure Proteine besonders geeignet, wenn nach der Elektrophorese Enzymaktivitäten nachgewiesen werden sollen (native PAGE). Bei der Probenvorbereitung und während des Laufs treten im Regelfall kaum Denaturierungen auf. Charakteristisch für dieses System ist das Fehlen von SDS, DTT oder Mercaptoethanol in Gelen, Laufpuffer und Probenpuffer. Die Trennung erfolgt nach der elektrophoretischen Beweglichkeit des jeweiligen Proteins, eine Molmassenzuordnung durch Vergleich mit Standards ist nur eingeschränkt möglich. Die Laufrichtung ist vom Minuspol zum Pluspol, als Markerfarbstoff wurde Bromphenolblau verwendet. Die Proben wurden wie unter 3.7.7 beschrieben behandelt und nicht gekocht. Das Gel setzte sich aus einem 6 %-igen Trenngel sowie einem 3,6 %-igen Sammelgel zusammen. Das Trenngel enthielt Tris-HCl, pH 8,8, mit einer Endmolarität von 0,375 M, das Sammelgel Tris-HCl, pH 6,8 mit einer Endmolarität von 0,0625 M. Der Laufpuffer enthielt 0,05 M Tris-HCl sowie 0,38 M Glycin, pH 8,3 und diente, mit Glycerol (10 % Endkonzentration) und Bromphenolblauzugabe, als Probenpuffer. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 15 Volt.

3.7.13 Western Blot

Zunächst wurden sowohl das SDS-Polyacrylamidgel als auch die Membran kurz in Transfer-Puffer äquilibriert. In einem Tablett, das mit Transfer-Puffer gefüllt war, wurden pro Gel je zwei der zur Transfer-Apparatur gehörigen Schwamm-Polster und zwei Stücke *Blotting*-Papier in der Größe des Gelhalters gut angefeuchtet. Die Gelhalter wurden mit der grauen Seite nach unten geöffnet in das Tablett gelegt, darauf ein angefeuchtetes Schwamm-Polster, gefolgt von einem Stück feuchten *Blotting*-Papier, auf dem das Gel positioniert wurde. Dann wurde die Membran auf das Gel gelegt. Es war wichtig, den gesamten Aufbau permanent nass zu halten und wiederholt mit einer Pasteurpipette auszurollen, um Luftblasen, die den Transfer behindern, zu vermeiden. Auf die Membran folgten ein weiteres Stück feuchtes *Blotting*-Papier und ein Schwamm-Polster, dann wurde der Gelhalter geschlossen und mit der grauen Seite zur Kathode hin in die Transfer-Apparatur geschoben. Der Tank wurde bis oben mit Transfer-Puffer gefüllt (ca. 1 l) und der Transfer 1 h (4 h auf Eis bei nativem Gel) auf einem Magnetrührer bei 100 V im Kühlraum durchgeführt. Anschließend wurde die Apparatur wieder auseinandergebaut, die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt (beim nativen Gel entfiel die Ponceau-Rot Färbung) und zum Blockieren in 5 % Magermilchpulver in TBS-T über Nacht im Kühlraum oder 1 h bei RT geschüttelt.

3.7.14 Western Blot-Analyse

(ECL-Methode von Amersham Pharmacia Biotech)

Die blockierte Membran wurde zum immunologischen Nachweis eines bestimmten Proteins 1-2 Stunden bei RT mit dem in 5 % Magermilchpulver in TBS-T verdünnten Antikörper unter Schütteln inkubiert (ca. 10 ml pro Membran bzw. 5 ml, wenn in Inkubationsbeutel eingeschweißt). Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran 2 - 3x kurz und anschließend 3x 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem 1:1000 in TBS-T/5 % Magermilchpulver verdünnten HRP-konjugierten zweiten Antikörper bei RT dauert 45 min bis eine Stunde. Es schlossen sich ein 15-minütiger und vier 5-minütige Waschschrte mit TBS-T an. Die abgetropfte Membran wurde zwischen die 2 Hälften eines zurechtgeschnittenen Rundbodenbeutels gelegt, mindestens 2 ml Detektionslösung (Mischung aus gleichen Volumina Detektionslösung 1 und Detektionslösung 2) gleichmäßig darauf verteilt und 1 min bei RT inkubiert. Nach Abtropfen der Detektionslösung wurde die Membran wiederum zwischen die 2 Hälften eines zurechtgeschnittenen Rundbodenbeutels eingepackt, in eine Filmkassette gelegt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit betrug je nach Stärke des Signals wenige Sekunden bis mehrere Minuten.

Sollten auf bereits zur Detektion verwendeten Membranen noch andere Proteine nachgewiesen werden, konnten durch eine 30-minütige Inkubation in *Stripping*-Puffer bei 60°C die gebundenen Antikörper entfernt werden. Danach wurde die Membran 2x 15 min bei RT mit TBS-T gewaschen, mindestens eine Stunde in 5 % Magermilch/TBS-T geblockt, und anschließend die Immundetektion wie oben beschrieben durchgeführt.

3.7.15 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Durch die Fixierung von Zellen und anschließendem Permeabilisieren sowie Inkubieren mit Antikörpern gegen ein spezifisches Protein kann die Lokalisierung bzw. Expression desselben sichtbar gemacht werden. Ist an diesen Antikörper nicht direkt ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so muss er durch einen zweiten Antikörper, der solch eine Farbstoff-Kopplung besitzt, erkannt werden (indirekte Immunfluoreszenz). Dies führt gleichzeitig zu einer Verstärkung des Signals. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann der Fluoreszenzfarbstoff durch Licht der richtigen Wellenlänge angeregt und sichtbar gemacht werden.

Intrazelluläre Parasiten, die für mindestens 24 h in einer konfluenten, auf Deckgläsern hochgezogenen HFF-Kultur gewachsen waren, wurden in PBS gewaschen (dieser und alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt). Es folgte die Fixierung der Zellen, die je nach Bedarf aus PBS/4 % Paraformaldehyd, PBS/4 % Paraformaldehyd/0.05% Glutaraldehyd oder aus Methanol (Fixierung bei -80°C mit Methanol, das bei -80°C gelagert worden war) bestand, für 20 min. Letztere beiden Fixierungen empfehlen sich besonders für

die Fixierung vakuolärer Proteine. Es folgte eine Inkubation für 3 min in PBS/0,1 M Glycin, um die Fixierung zu neutralisieren (gilt nicht für die Methanolfixierung).

An den Fixierungsschritt schloß sich ein 20-minütiger Permeabilisierungsschritt mit PBS/0,2 % Triton X-100 an, der bei methanolfixierten Zellen ausgelassen wurde, da Methanol zu Delipidierung der Membran führt und dieser Schritt somit hinfällig ist. Dann folgte ein 20-minütiger Blockierungsschritt mit PBS/0,2 % Triton X-100/2 % BSA, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation mit dem/den relevanten Antikörper/n, adäquat verdünnt in Blockierungslösung. Nach 3 x 5 min Waschen mit Waschlösung (= Permeabilisierungslösung) folgte die Inkubation mit dem/den sekundären, fluoreszenzgekoppelten, 1:1000 verdünnten Antikörper/n für 45 min bis 1 h. Wiederum folgten 3 Waschschritte zu jeweils 5 Minuten, anschließend wurden die Zellen mit DAPI gewaschen (0,1 µg/ml DAPI/PBS, interkaliert in die DNA), nochmals mit PBS gewaschen und auf Objektträger mit Einbettmedium eingebettet. In Kartonmappen wurden die Präparate bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

3.7.16 Direkte Immunfluoreszenzanalyse mit GFP

Das grün fluoreszierende Protein, ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert, kann direkt mikroskopiert werden (selbst lebende Zellen können damit mikroskopiert werden). In dieser Arbeit wurden GFP-Fusionsproteine in *T. gondii* hergestellt und detektiert. Intrazelluläre Parasiten, die GFP exprimieren, wurden wie in Abschnitt 3.7.15 beschrieben fixiert und danach direkt für die IFA eingebettet.

3.7.17 Herstellung von Antikörpern

Die Bindung von Peptiden an *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) erfolgte über eine Maleimid-Kopplung. Hierzu wurden 1,5 mg Peptid in 150 µl PBS, pH 7,4, gelöst, mit 150 µl Maleimid-aktiviertem KLH (Imject™, 10 mg/ml) versetzt und 2 h bei RT inkubiert. Die Kopplungslösung wurde ü.N. gegen insgesamt 3 l PBS, pH 7,4 dialysiert, um das EDTA zu entfernen. Das gekoppelte Peptid wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml mit PBS eingestellt, aliquotiert und bis zu seiner Verwendung bei -80°C gelagert. Für jede Immunisierung wurden 150 µl gekoppeltes Peptid (= 150 µg) mit PBS auf 300 µl aufgefüllt und mit 300 µl Freund'schem Adjuvants (komplett für Erstimmunisierung, inkomplett für Folgeimmunisierung) so lange durch eine Kanüle gezogen, bis eine stabile Emulsion entstand. Vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut abgenommen - Präimmenserum - welches im *Western Blot* auf das Vorhandensein unspezifischer Antikörper überprüft wurde. Kaninchen wurden mit je drei Depotinjektionen an den Tagen 28, 56 und 77 nach Erstimmunisierung (Tag 0) injiziert. Der Erfolg der Immunisierung wurde mittels *Western Blot* jeweils 14 Tage nach der Immunisierung überprüft. Das Ausbluten der Kaninchen

erfolgte an Tag 96. Das Blut wurde erst 1 h bei 37°C inkubiert, dann ü.N. bei 4°C, um eine Koagulation und Kontraktion des Blutkuchens zu erreichen. Der Blutkuchen wurde durch Zentrifugation (10 min, 9200 rpm, 4°C, SS34-Rotor) vom Serum abgetrennt und das Serum in neue Gefäße überführt. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Serum in neue Gefäße aliquotiert und bei -80°C langzeitgelagert. Die sich im Gebrauch befindenden Seren wurden entweder 1:1 mit Glycerol versetzt und bei -20°C aufbewahrt oder aber bei 4°C, versetzt mit 0,02 % Natriumazid. Die Herstellung der Anti-*T. gondii* Pxn2 Antikörper (inklusive der Peptide) wurde von der Firma EUROGENTEC durchgeführt, die Kopplung des Peptides erfolgte an KLH. Vor der ersten Immunisierung wurde Präimmunserum genommen; die *boosts* erfolgten zweimal nach 14 Tagen, anschließend nach 28 Tagen. Blut zum Testen wurde 10 Tage nach dem zweiten *boost* bzw. 10 Tage nach dem dritten *boost* genommen; das Ausbluten erfolgt 30 Tage nach dem dritten *boost*.

3.7.18 Vorbereitung der Dialyseschläuche

Die Dialyseschläuche (MWCO 12000-14000) wurden 5 min in 200 mM NaHCO₃/5 mM EDTA pH 8,0 gekocht und anschließend mit H₂O gespült, in Schottflaschen überführt und nochmals 5 min in 200 mM NaHCO₃/5 mM EDTA gekocht. Es erfolgte noch ein Waschschrift mit H₂O, anschließend wurden die Schläuche bei 4°C in H₂O gelagert.

3.7.19 Aufreinigung der Antikörper mittels Affi-Gel® 15 Gel

Die verwendete Matrix Affi-Gel® 15 Gel ist besonders für azidische Proteine/Peptide, da sie eine positive Ladung besitzt. Gekoppelt werden können Liganden mit primären Aminogruppen. Kovalente Amidbindungen koppeln das Protein/Peptid an die terminale Carboxylgruppe der Matrix. 2 mg Peptid wurden mit 3, 5 ml Kopplungspuffer (50 mM Hepes, pH 5) in einem 4,5 ml Kryo-Röhrchen aufgenommen; der pH des Puffers musste etwas höher liegen als der isoelektrische Punkt des Peptides, da die Matrix leicht positiv geladen ist. Die Matrix wurde folgendermaßen vorbereitet: 2 ml wurden auf die Membran (50 mm Durchmesser) eines Vakuum-Filtersystems (150 ml Volumen) gegeben und das Vakuum angelegt. Es wurde 5x mit 30 ml H₂O (4°C) im Kühlraum gewaschen, wobei penibel darauf geachtet wurde, dass die Matrix nicht komplett trocken lief. Am Ende wurde die Matrix etwas trockener laufen gelassen, ihr Endvolumen betrug nun ca. 1 ml, und sofort in das Kryoröhrchen überführt, in dem sich schon das Peptid in Kopplungspuffer befand. Das Kryoröhrchen wurde ü.N. bei 4°C über Kopf rotiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm, 4°C, für 5 min, die Zentrifuge wurde ohne Bremse auslaufen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und die Matrix für mindestens 1 h mit 3 ml 50 mM Tris, 50 mM Hepes Puffer, pH 7.2, blockiert. Wiederum schloß sich ein Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm, 4°C, für 5 min an. Die Matrix wurde dann 3x mit kaltem H₂O gewaschen, nach jedem

Waschschritt folgte eine Zentrifugation bei 1600 rpm, 4°C, für 3 min. Danach wurde 2x mit 0,1 M Glycin, pH 2,5 (Eluierungspuffer) gewaschen, nach jedem Waschschritt erfolgte wiederum eine Zentrifugation bei 1600 rpm, 4°C, für 3 min. Anschließend wurde mit 100 mM Tris, pH 8, gewaschen, bis die Matrix neutral wurde. Es wurden 2 ml Serum mit 10x TBS derart versetzt, dass sie in Serum in 1x TBS resultierte. Von der Matrix wurde der Überstand abgenommen und das Serum in 1x TBS in das Röhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde ü.N. bei 4°C über Kopf rotiert. Die Lösung wurde am nächsten Tag in eine Chromatographie-Säule von Biorad überführt (*Bio Rad®Bio Spin® chromatography column*). Der Durchlauf (ca. 2 ml) wurde gesammelt, weil er nicht gebundene (unspezifische) Antikörper enthalten sollte. Bevor die Säule wiederum trocken lief, wurde mit insgesamt 10 ml TBS gewaschen und auch gesammelt, falls die (spezifischen) Antikörper sich durch das Waschen eventuell gelöst haben sollten. Es schloß sich die Eluierung mit 2 ml 0,1 M Glycin, pH 2,5 an. Gesammelt wurde jeweils ein Volumen von 500 µl Eluat in einem Reaktionsgefäß, in dem schon ca. 40 µl (muss zuvor durch pH Papier experimentell ermittelt werden) 1 M Tris, pH 8, zum Neutralisieren vorgelegt waren. Zum Stabilisieren wurde der Antikörperlösung noch 1 % BSA zugegeben. Anschließend wurden das gereinigte Serum, der Durchlauf sowie der gesammelte Waschpuffer auf dem *Western Blot* getestet.

3.8 Enzym-assays

3.8.1 Enzymatische Messung der Katalase-Aktivität

Das Protokoll zur Ermittlung der Katalase-Aktivität wurde einer Anleitung der Firma Boehringer für deren käufliche Katalase entnommen, welche auch als Referenz diente. Der *assay* beruht darauf, dass Wasserstoffperoxid sein Absorptionsmaximum bei 240 nm besitzt. In diesem *assay* wird die Änderung der optischen Dichte bei 240 nm pro Zeiteinheit erfaßt, was ein Maß für die Katalase-Aktivität ist, die das Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff zerlegt. Vorsicht ist bei der Menge des Substrates geboten, da die Katalase-Kinetik nicht dem „normalen“ Enzymmuster entspricht, zum einen, weil die Katalase nicht saturierbar ist, zum anderen, weil sie durch zu hohe Wasserstoffperoxidmengen inaktiviert wird.

Es wurde eine 25 cm² Vero Kultur-Flasche mit frisch lysierenden Toxoplasmen verwendet und dem unter 3.7.5 beschriebenen Zellaufschluß mit Triton X-100 PC unterzogen. Da es sich bei der Katalase um ein oxidatives Enzym handelt, wurde peroxidfreies (PC) Triton X-100 verwendet. Der *assay* wurde in einer 1 ml Quarzküvette durchgeführt, mit Puffer II (50 ml Puffer I (Referenz), s. 3.7.5, der mit ca. 60 µl 30 % H₂O₂ auf eine OD₂₄₀ = 0,5 ± 0.010 eingestellt wurde; übersteigt die Wasserstoffperoxidkonzentration 0,1 M, so wird die Katalase inaktiviert, weil sich die sogenannten (inaktiven) *Compounds II* und *III* formieren). Es wurden für den *assay* 1 - 20 µl *T. gondii* Zellextrakt mit der zu 1 ml komplementären, bereits in der

Küvette vorgelegten Menge Puffer II gemischt und im 3 s-Takt bei 25°C (Beckmann DU® 7400) und 240 nm vermessen. Aus der Abnahme wurde dann die Aktivität der Katalase ermittelt. Als Kontrolle diente Böhlinger Katalase aus Rinderleber (20 mg/ml, 65000 U/mg bei 25°C und H₂O₂ als Substrat; Verdünnung für die Messung 1:2000, hiervon wurden unterschiedliche Mengen in Puffer II vermessen). Die Zellextrakte und die käufliche Katalase wurden der Genauigkeit wegen mit Glaskapillaren pipettiert.



$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot \Delta t \cdot v_i}$$

$$\text{Spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{\text{Volumenaktivität [U/ml]}}{\text{Proteinkonz. d. Enzymlg. [mg/ml]}}$$

3.8.2 Enzymatische Messung der Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivität

Für diesen *assay* wurden die gleichen Zellextrakte wie für den Katalase-*assay* verwendet, wodurch gleichzeitig die Kontrolle bestand, ob die Extrakte prinzipiell noch enzymatisch aktiv sind, da bisher keine Glutathion-Peroxidase in *T. gondii* beschrieben wurde. Der *assay* wurde im Beckmann DU®-65 Spectrophotometer bei 340 nm in einer 90 µl Küvette bei 25°C durchgeführt. Es handelt sich hier um einen gekoppelten *assay*, der auf der Änderung der Absorption bei 340 nm durch die Umsetzung von NADPH + H⁺ zu NADP⁺ beruht. Als Referenz diente in diesem Fall die Luft, da die Absorption der Küvette allein schon bei 0,5 lag; die OD₂₄₀ wurde zwischen den Grenzwerten 0,5 bzw. 1,5 gemessen, die Laufgeschwindigkeit des Schreibers betrug 10 mm/min.

Bevor das Glutathion (GSH) eingesetzt werden konnte, wurde es zur Bestimmung der freien Thiolgruppen dem sogenannten Ellman-Test unterzogen (s. 3.8.3). Anschließend konnte der Prämix angesetzt werden, der aus folgenden Komponenten bestand: 780 µl 100 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6, ferner 25 µl NADPH, 6 mM, in dem zuvor genannten Tris-Puffer sowie 50 µl GSH, 20 mM (in H₂O/Essigsäure).

Für den *assay* selbst wurden 77 µl Prämix in der Küvette vorgelegt (Endkonzentration von NADPH und GSH in dem 90 µl Ansatz: 150 µM bzw. 1 mM), anschließend wurden mit einer Glaskapillare 5 µl humane Glutathion-Reduktase (hGR, 15 U/ml, Konzentration im *assay* 75 mU) zugegeben. Die Komponenten durften so lange miteinander reagieren - z. B. oxidiertes Glutathion mit der hGR - bis sich wieder eine *baseline* gebildet hatte. Dann wurden 5 µl des Zellextraktes zugegeben und wiederum gewartet, bis sich eine *baseline* bildete, da Bestandteile des Extraktes mit GSH zu reagieren vermögen. Anschließend wurden 3 µl Cumolhydroperoxid zugegeben, 6 mM in H₂O, was in einer Konzentration im *assay* von 200 µM resultierte. Die Abnahme bei A₃₄₀ pro Zeiteinheit, die den Verbrauch von NADPH anzeigt, ist somit ein Maß für die GPx-Aktivität. Es wurden auch Messungen mit 10 µl

Zellextrakt durchgeführt, hierfür mussten alle anderen Reagenzien dementsprechend verändert zugegeben werden, um bei gleichem Volumen (90 μl) die gleichen Molaritäten bzw. Aktivitäten zu erhalten.

3.8.3 Ellman-Test zur Bestimmung freier Thiole

Der Test beruht darauf, dass das Thiolat der 5-Mercapto-2-nitro-benzoesäure im Gegensatz zum entsprechenden Disulfid DTNB ein Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweist. Ein basischer pH (8) ist für die Bildung der Thiolate sehr wichtig. 800 μl 50 mM KH_2PO_4 , pH 8, wurden mit 20 μl 10 mM DTNB („Ellman-Reagenz“) in einer Küvette vermischt und als Nullwert benutzt. Anschließend wurde 1 μl einer zu testenden 20 mM GSH Lösung hinzupipettiert. Über die Formel $A = c \times \epsilon \times d \times D$, wobei A die Absorption, c die Konzentration, ϵ den Extinktionkoeffizienten (13600 M^{-1}), d die Schichtdicke der Küvette (1 cm) und D die Verdünnung der Lösung (1:821) bezeichnet, konnte die Konzentration der GSH-Lösung aufgrund der Absorptionsdifferenz ermittelt werden.

3.9 Behandlung der Zellen mit Peroxid

3.9.1 Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid

Um die Sensitivität verschiedener Zelllinien gegenüber Wasserstoffperoxid festzustellen, wurde ein Wasserstoffperoxid-*assay* etabliert. Hierbei wurden frisch lysierende (= extrazelluläre) *T. gondii* Tachyzoiten einer 25 cm^2 Vero Kultur-Flasche mit verschiedenen Konzentrationen Wasserstoffperoxid inkubiert. Die Lösung zum Inkubieren war DMEM ohne FCS-Komplementierung, jedoch, wie sonst auch, inklusive Glutamin (DMEM FCS $\bar{}$), da das FCS durch darin enthaltene thiolhaltige Proteine als Puffer gegenüber dem Peroxid wirken könnte.

Die Parasiten wurden zunächst gezählt und anschließend derart in DMEM Medium ohne FCS-Komplementierung (DMEM FCS $\bar{}$) verdünnt, dass sich in 100 μl , maximal jedoch in 120 μl , 3×10^6 Parasiten befanden. Pro Wasserstoffperoxidkonzentration wurden 100 μl – 120 μl der so verdünnten Parasiten-Lösung verwendet und in ein *well* einer 12 *well* Schale überführt. Hierzu wurden 2 ml der jeweiligen Wasserstoffperoxidlösung gegeben und gemischt. Verwendete Wasserstoffperoxidkonzentrationen waren 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M Wasserstoffperoxidlösung (d.h. 30 %-ige Wasserstoffperoxidlösung wurde in DMEM FCS $\bar{}$ auf die obengenannten Konzentrationen verdünnt). Als Kontrolle diente die Inkubation mit DMEM FCS $\bar{}$ allein.

Die Inkubation der Zellen mit dem Wasserstoffperoxid fand für 11/2 h im Inkubator bei 37°C, 5 % CO_2 , statt. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 10

min bei RT und 1200 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt war notwendig, weil die Parasiten anschließend zum Infizieren von auf Deckgläschen wachsenden HFF-Zellen verwendet wurden (s. 3.7.15), welche gleichermaßen durch das Wasserstoffperoxid geschädigt worden wären, was eine Auszählung unmöglich gemacht hätte. Das resultierende Zellpellet wurde in komplementiertem Medium aufgenommen, ein Drittel hiervon 1:10 verdünnt und hiermit die HFF Zellen infiziert (sollte einer Menge von 1×10^5 Parasiten entsprechen), die auf Deckgläschen wuchsen. Nach 48 h Inkubation wurden die infizierten Zellen mit PBS/ 4% Paraformaldehyd fixiert, DAPI gewaschen und eingebettet. Die Auszählung der Vakuolen erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop, wobei nur solche Vakuolen in die Zählung mit eingeschlossen wurden, in denen sich ≥ 4 Parasiten befanden. Ausgezählt wurden pro Wasserstoffperoxidkonzentration 6 unterschiedliche Ausschnitte unter dem 40er Objektiv. Von diesen 6 Werten wurde ein Durchschnittswert errechnet, aus welchem wiederum ein Durchschnittswert aus 3 unabhängigen Experimenten berechnet wurde. Innerhalb einer Zelllinie wurde die Anzahl der Vakuolen, gemessen an der Anzahl der Vakuolen in der Kontrolle, als Prozente ausgedrückt, um einen direkten Vergleich der Werte einzelner Zelllinien zu haben, der von ihrer Viabilität unabhängig ist.

3.10 Untersuchung der Katalase-defizienten Toxoplasmen im Mäusemodell

3.10.1 *in vivo* Virulenztest

Für diesen Versuch wurde der *T. gondii* Prugniaud Stamm verwendet. Verglichen wurden Parasiten, die mittels des Vektors pHD1055 das Katalase-Gen ausgeschaltet hatten, mit Parasiten, die zwar den *HXGPRT*-Marker integriert hatten, aber immer noch Katalase positiv waren. Außerdem wurde noch eine Prugniaud Zelllinie hergestellt, die, auf dem Katalase *knock out* basierend, mittels Transfektion mit Katalase cDNA sowie Kotransfektion mit Chloramphenicolacetyltransferase, wieder Katalase exprimierte.

Es wurden C57BL/6 Mäuse zum Infizieren verwendet, wobei es sich um genetisch identische Mäuse eines Inzuchtstammes handelte, die das gleiche Alter - 8 Wochen - sowie das gleiche Geschlecht - weiblich - hatten. Dieser Stamm zeichnet sich durch seine Empfänglichkeit gegenüber einer durch die Toxoplasmen verursachten Enzephalitis aus. Die Mäuse werden nach der Infektion krank, verlieren das Gleichgewicht, entwickeln eine Enzephalitis, die sie nicht gut kontrollieren können und sterben.

Der Inhalt einer 25 cm² Vero Kultur-Flasche mit frisch lysierenden Toxoplasmen wurde bei 65-70 g 5 min bei 4°C zentrifugiert, um Veros und Zelltrümmer zu pelletieren. Der so gewonnene Überstand wurde dann mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt (Waschschritt) und bei 1200 rpm 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und

das Pellet in 50 ml HBSS (Raumtemperatur) resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm 10 min bei 4°C, woraufhin wieder der Überstand abgenommen und das Pellet in 50 ml HBSS aufgenommen wurde. Es folgte eine neuerliche Zentrifugation bei 1200 rpm 8 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 3 ml HBSS aufgenommen.

Von diesen 3 ml wurden dann 50 µl abgenommen und in ein Eppendorfgesäß überführt überführt, in dem sich bereits 400 µl isotonische Kochsalzlösung sowie 50 µl 0.4 %-ige Trypanblau-Lösung befanden. Die Reaktivität dieses Farbstoffs beruht darauf, dass das Chromophor negativ geladen ist und nur dann mit der Zelle reagiert, wenn die Zellmembran beschädigt ist. Somit können tote von lebenden Zellen unterschieden werden. Allerdings sollte der Farbstoff nicht allzu lange mit den Zellen inkubiert werden, da ansonsten der Farbstoff auch in lebende Zellen eindringt. Anschließend wurden die Toxoplasmen gezählt und mit HBSS auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

4 Mäuse (5 Mäuse) (6 Mäuse)	2500 Parasiten
5 Mäuse (5 Mäuse) (6 Mäuse)	10 000 Parasiten
4 Mäuse (5 Mäuse)	100 000 Parasiten

Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt. In Klammern die Anzahl der Mäuse, die beim zweiten bzw. dritten Mal infiziert wurden. Die Parasitenzahlen waren die gleichen.

Infiziert wurde peritoneal mit je 0,5 ml Parasiten in HBSS. Der Verlauf der Infektion wurde über die folgenden Wochen dokumentiert, nach 4-5 Wochen wurde auf Anti-*T. gondii* Serologie getestet.

3.11 Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Werkbank (*Laminar Flow Hood*) unter Verwendung steriler Materialien, Medien und Lösungen durchgeführt. Die Toxoplasmen wurden, soweit nicht anders erwähnt, in einer Beckman-Zellkulturzentrifuge pelletiert.

3.11.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Seitlich wurde ein Tropfen Zellsuspension (meist 1:10 verdünnt) unter das Deckglas gegeben und unter dem Mikroskop die Zellen, die sich in 25 kleinen 16er-Quadraten befanden, ausgezählt. Die so erhaltene Zahl mit 1×10^4 multipliziert ergab die Zellzahl/ml.

3.11.2 Kultivierung von *T. gondii* und Wirtszellen

In dieser Arbeit wurde der virulente *T. gondii* RH Stamm oder eine Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphorybosyltransferase negative Mutante von RH, RH-*hxgprt* (Donald et al, 1996) verwendet. Prugniaux-*hxgprt* wurde im Labor Soldati durch homologe Rekombination erzeugt. (M. Soete, unveröffentlicht).

Die Parasiten wurden in HFF (*human foreskin fibroblasts*) oder Vero-Zellen (*african green monkey kidney cells*) kultiviert. Bei den HFF Zellen handelt es sich um primäre Zellkulturen; sie entstehen ihrerseits aus Explant-Kulturen, bei denen ganze Gewebestücke angelegt werden, aus denen die Einzelzellen dann herauswachsen. Primäre Zellkulturen sind in ihrer Teilungsfähigkeit limitiert, bei den HFF Zellen sind dies ca. 40 Zellteilungen. Aus den Primärlinien entsteht durch erneute Trypsin-Behandlung und Aufteilung der Zellen in mehrere Kulturschalen eine Zelllinie. Diesen Aufsplittungsvorgang nennt man Subkultivierung bzw. Zellpassage. HFF Zellen eignen sich durch ihr Auswachsen als Einzelschicht (*monolayer*) besonders für sensitive Versuche, wie z. B. IFA (s. 3.7.15) sowie Selektion und Klonierung von stabil transfizierten Toxoplasmen. Bei den Vero-Zellen handelt es sich um eine etablierte Zelllinie mit fibroblastenartiger Morphologie. Sie besitzen keine Kontaktinhibition und können so bis zu vier Lagen übereinander wachsen. Sie eignen sich daher zur Passage und Gewinnung großer Mengen an Toxoplasmen.

Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) mit 10 % Fötalem Kälberserum (FCS) im befeuchteten Brutschrank unter 5 % CO₂.

3.11.3 Passagieren der Wirtszellen

Die verwendeten Wirtszellen wachsen adhärent. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit einer Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen, um das FCS zu entfernen, und anschließend durch Inkubation mit Trypsin-EDTA für ca. 10 min bei 37°C von der Schale abgelöst. Danach folgte die Zugabe von Medium und das Aufteilen in neue Kulturschalen.

3.11.4 Einfrieren und Auftauen von Parasiten

Zum Einfrieren wurden HFF- oder Vero-Zellen mit Parasiten infiziert. Die Wirtszellen sollten vor dem Einfrieren möglichst viele Toxoplasmen enthalten. Die Trypsinierung erfolgte wie unter 3.11.3 beschrieben. Die abgelösten Zellen wurden in 500 µl 50 % DMEM/50 % FCS (kalt) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden 500 µl 80 % DMEM/20 % FCS, eiskalt, zugegeben, gemischt und das Röhrchen mehr als 24 h bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurde das Röhrchen kurz in ein 37°C Wasserbad gegeben und der Inhalt anschließend in ein 15 ml Röhrchen überführt, in dem schon 5 ml

Medium vorgelegt waren. Nach einem Zentrifugationsschritt bei RT für 10 min, 800 rpm, wurde das Pellet in Medium aufgenommen und hiermit konfluente HFF Zellen inokuliert.

3.11.5 Transiente Transfektion von *T. gondii*

Die transiente Transfektion wurde wie von Soldati und Boothroyd (Soldati und Boothroyd, 1993) beschrieben durchgeführt. Bei dieser Methode verbleibt die DNA extrachromosomal und geht nach einiger Zeit verloren, da die hier verwendeten Plasmide keinen Replikationsursprung für die autonome Vermehrung in *T. gondii* besitzen. Die Parasiten mussten für eine Transfektion, ob transient oder stabil, immer extrazellulär vorliegen, d.h. die Toxoplasmen (25 cm² Kultur-Flasche mit Vero-Zellen) mussten ihre Wirtszellen gerade frisch lysiert haben. Die Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in die Parasiten eingebracht. Die Toxoplasmen wurden bei 1200 rpm 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die sedimentierten Parasiten wurden in 3 - 5 ml Elektroporationspuffer (Cytomix) (van den Hoff et al., 1992) resuspendiert und danach für weitere 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in mit 3 mM ATP und 3 mM GSH komplementiertem Cytomix aufgenommen, so dass ca. 1×10^7 - 5×10^7 Parasiten pro ml vorlagen. Daraufhin wurden 30 bis 100 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA (gelöst in H₂O) hinzugefügt. Das Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette (4 mm Durchmesser) überführt, die Elektroporation erfolgte bei einem Resistenzwiderstand von 48 Ohm, 2 kV (bei Prugniaud 1,5 kV) und einer Elektroporationsdauer von ca. 0,4 ms im *Electro Cell Manipulator 600* von BTX. Nach der Elektroporation wurden die Parasiten auf HFF-Zellen gegeben.

3.11.6 Stabile Transfektion und Selektion

In *T. gondii* erfolgt die Integration von linearisierter Plasmid-DNA ungerichtet ins Genom. Die Anzahl der Kopien ist dabei variabel. Essentiell für die Methode ist, dass man über einen geeigneten Marker verfügt, mit dem man auf die das Gen enthaltenden Zellen selektionieren kann. Der Selektionsmarker und das zu exprimierende Gen können entweder auf dem gleichen Plasmid liegen oder auf zwei verschiedenen Plasmiden. Im zweiten Fall wird eine Kotransfektion und REMI (Restriction Enzyme Mediated Insertion, (Black et al., 1995) durchgeführt. Die REMI erhöht den Einbau von Fremd-DNA in das Genom um das 400-fache; hierbei werden Restriktionsenzyme in den Elektroporationsansatz zugegeben. Diese setzen zufällige Schnitte in der genomischen DNA und aktivieren so vermutlich das DNA-Reparatur-System. Die verwendeten Plasmide wurden vor der Transfektion durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert. Die Transfektion erfolgte, wie bereits beschrieben, unter Verwendung von RH-*hxgprt*-Parasiten. Dem Elektroporationsansatz wurden 30-100 µg des zu transfizierenden Plasmids, bei Kotransfektionen zudem 15-30 µg des linearisierten Selektionsvektors sowie 100 U Enzym zugegeben. Die Selektion auf

Parasiten, die das Chloramphenicolacetyltransferase-Gen trugen, erfolgte über ca. 6 Tage mit 20 µM Chloramphenicol (Kim et al., 1993), das direkt nach der Transfektion zugegeben werden konnte. Die Selektion auf *HXGPRT*-positive Parasiten wurde für 2-4 Tage in Medium mit 25 µg/ml MPA (Mycophenolsäure) und 50 µg/ml Xanthin durchgeführt (Donald et al., 1996), mit der Selektion wurde einen Tag nach der Transfektion begonnen. Nach Abschluß der Selektion wurden Einzelklone über limitierende Verdünnung in 96-er Mikrotiterplatten mit konfluenten HFF-Zellen isoliert. Hierzu wurden die Vertiefungen der Platte mit je 150 µl Selektionsmedium befüllt. Von der ersten Reihe wurde das Medium abgenommen und einige Tropfen frisch lysierende selektionierte Zellen in jede Vertiefung gegeben, anschließend wurden mit einer Multipipette 25-50 µl Zellen in jede weitere Reihe gegeben und gut durchmischt. Nach 6-10 Tagen Inkubation (ohne Bewegung) waren in der Zellschicht Parasitenplaques zu sehen. Die Parasiten konnten dann in größere Schalen mit konfluenten HFF-Zellen transferiert werden.

3.11.7 Stabile Transfektion zur Herstellung von *knock out* Mutanten

Zur Herstellung von *knock out* Mutanten in *T. gondii* wurden Plasmide verwendet, bei denen eine Resitenzkassette von den 5'- und 3'-flankierenden Bereichen des auszuschaltenden Gens eingeschlossen wurde. Es wurden parallel mehrere Transfektionen mit verschiedenen Konzentrationen des linearisierten Plasmides durchgeführt. Da REMI die nichthomologe Rekombination fördert, wurde diese Methode hier nicht angewendet.

3.12 Sequenzanalyse

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem DNASTar Programmpaket analysiert (DNASTar, Madison, USA). Homologie-Suchen (blastp- oder tblastn-Algorithmus) wurden auf dem GenBank-Server, der *Toxoplasma gondii* Clustered EST Database sowie der PlasmoDB (*Plasmodium*) durchgeführt. Der Vorhersage von Transmembrandomänen diente das Phd-Programm des EMBL-Servers (Rost et al., 1995).

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung einer putativen *Katalase* im EST-Sequenzierprojekt

Basierend auf meiner Diplomarbeit wurde diese Doktorarbeit fortgeführt. Zu Beginn der Diplomarbeit gab es in der Literatur keinerlei Hinweise für das Vorhandensein von *microbodies*, welche die Organellen Glyoxysomen, Peroxisomen und Glykosomen beinhalten, im Phylum Apicomplexa. *Microbodies* sind in fast allen Eukaryonten zu finden. Im Zuge des EST-Sequenzierprojektes (*Expressed Sequence Tag*) (Ajioka et al., 1998) wurden zwei ESTs (TgESTzy67b01.rl, GenBank *accession number* W63499 bzw. TgESTzz06g03.rl, *accession number* W99737) gefunden, deren abgeleitete Proteinsequenz Ähnlichkeit mit Katalase, dem peroxisomalen Markerenzym, zeigten. Diese zwei ESTs wurden in meiner Diplomarbeit kloniert und sequenziert. Es stellte sich heraus, dass es sich um identische Sequenzen handelte. Mittels dieser Sequenzinformation wurde durch PCR auf das Plasmid TgESTzz06g03.rl eine *Katalase*-Sonde hergestellt und mit *Pst*I verdaut, um störende *bluescript-polylinker* Sequenzen zu entfernen, die noch aus dem Vektor für den EST stammten. Diese Sonde hatte eine Größe von 355 bp und wurde für einen *Southern Blot* mit *T. gondii* genomischer DNA verwendet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei der gefundenen *Katalase* nicht um eine Kontamination durch die humanen Wirtszellen des Parasiten handelte, ferner, dass die *Katalase* als Einzelkopie im haploiden Genom vorliegt. Da der EST Klon nicht die gesamte kodierende Sequenz enthielt, wurde durch das Labor von Dr. Jim Ajioka (Department of Pathology, Cambridge, UK) ein *screen* auf Cosmide, die *Toxoplasma* RH Stamm genomische DNA enthalten, mit der obengenannten Sonde durchgeführt und 5 positive Cosmide identifiziert: D8-120, E9-111, A9-93, A7-88, D5-70. Diese Cosmide wurden mir zur Verfügung gestellt. Mit diesen Ergebnissen endete die Diplomarbeit.

In der vorliegenden Arbeit sollte die *T. gondii* Katalase und ihre Lokalisation in der Zelle charakterisiert werden.

4.1.1 Ermittlung der Gen-Sequenz der *T. gondii* Katalase mittels *primer walking* und Charakterisierung des Gen-Lokus

Zunächst wurde eine *T. gondii* Katalase-DNA-Sonde hergestellt, die der für den genomischen *Southern Blot* entsprach, jedoch nicht Digoxigenin-markiert war. Diese Sonde wurde erzeugt durch eine PCR auf den EST-Klon TgESTzz06g03.rl, der Teile der *T. gondii* Katalase enthält, mittels des *sense primers* cz828 und des *antisense primers* cz830. Sie wurde von Dr. Jim Ajioka (Department of Pathology, Cambridge, UK) für das *screening* einer RH Cosmid Bank verwendet. Es wurden fünf positive Cosmide gefunden: D8-120, E9-111, A9-93, A7-88, D5-70.

Diese Cosmide wurden einem *Southern Blot* mit der obengenannten, in diesem Falle Digoxigenin-markierten Sonde, unterzogen und erwiesen sich allesamt als positiv (Daten nicht gezeigt). Die Sequenz des Katalase-Gens wurde anschließend durch *primer walking* über 9458 bp auf verschiedene dieser Cosmide ermittelt, je nach der Sequenzierbarkeit. Die doppelsträngigen Sequenzierungen wurden bei der Firma Toplab, Martinsried, durchgeführt. Der offene Leserahmen der *T. gondii* Katalase umfasst 1506 Basenpaare und kodiert für ein Protein aus 502 Aminosäuren mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 57,170 kDa. Das Enzym endet mit dem Tripeptid –AKM, welches dem Konsensus für PTS1-Signale entspricht (*Peroxisomal Targeting Signal*, (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) (Subramani, 1998). Weitere Varianten dieses Signals sind möglich. Dem Start-Codon geht die Sequenz AAA voraus, ein häufig bei *T. gondii* beobachteter Translationskontext (Seeber, 1997) (nicht gezeigt).

Das Katalase-Gen wird von insgesamt acht Introns unterbrochen, s. Abb. 4.2 A, die Intron/Exon Spleißstellen entsprechen dem Konsensus.

Folgende Seite: Abb. 4.1 Nukleotid-Sequenz (kodierender Bereich) und die abgeleitete Proteinsequenz der *T. gondii* Katalase. Das Protein endet mit dem Tripeptid -AKM, welches dem Konsensus für PTS1-Signale (*Peroxisomal Targeting Signal*) entspricht. Die erste Aminosäure eines Exons ist jeweils unterstrichen und fett gedruckt.

1 ATG ACT CAG GTT CCG CCC GTA ACA TTC CAG CAG TAT GGA CCG GTT ATC ACG ACC TCT GCT
 1 **M** T Q V P P V T F Q Q Y G P V I T T S A
 61 GGG AAC CCA GTC GAT GAC AAC CAA AAC TCG GTA ACT GCT GGA CCC TAC GGC CCC GCG ATC
 21 G N P V D D N Q N S V T A G P Y G P A **I**
 121 CTG AGT AAC TTC CAT CTC ATC GAC AAG CTG GCC CAC TTC GAT CGA GAA CGC ATT CCC GAG
 41 L S N F H L I D K L A H F D R E R I P **E**
 181 CGC GTT GTG CAT GCC AAG GGC GGT GGC GCC TTT GGC TAT TTC GAG GTC ACT CAT GAC ATC
 61 R V V H A K G G G A F G Y F E V T H D I
 241 ACC AGG TTC TGC AAA GCG AAG CTG TTC GAG AAA ATC GGA AAG CGG ACG CCT GTG TTT GCA
 81 T R **F** C K A K L F E K I G K R T P V F A
 301 CGT TTT TCG ACG GTG GCT GGC GAG TCG GGG AGT GCG GAC ACC AGG CGC GAC CCG CGC GGC
 101 R F S T V A G E S G S A D T R R D P R G
 361 TTC GCA CTC AAG TTC TAC ACG GAG GAG GGG AAC TGG GAC ATG GTT GGA AAC AAC ACT CCT
 121 F A L K F Y T E E G N W D M V G N N T P
 421 ATC TTT TTC GTT CGA GAC GCC ATA AAG TTC CCC GAC TTC ATT CAT ACG CAG AAG CGG CAT
 141 I F F V R D A I K F P D F I H T Q K R H
 481 CCG CAA ACG CAC CTC CAC GAC CCG AAC ATG GTG TGG GAT TTC TTC TCG CTC GTT CCG GAA
 161 P Q T H L H D P N M V W D F F S L V P E
 541 AGT GTG CAT CAA GTG ACC TTC CTG TAC ACG GAC CGT GGC ACA CCG GAC GGC TTC CGC CAT
 181 S V H Q V T F L Y T D R G T P D G F R H
 601 ATG AAT GGC TAC GGG AGT CAC ACG TTC AAA TTC ATC AAC AAG GAC AAC GAA GCC TTT TAT
 201 M N G Y G S H T F K F I N K **D** N E A F Y
 661 GTC AAG TGG CAC TTC AAG ACA AAC CAA GGA ATC AAG AAC CTG AAC AGA CAG CGC GCA AAA
 221 V K W H F K T N Q G I K N L N R Q R A K
 721 GAA CTC GAG AGC GAA GAT CCT GAC TAC GCG GTT CGT GAC CTG TTC AAC GCC ATT GCC AAG
 241 E L E S E D P D Y A V R D L F N A I A K
 781 CGA GAG TTT CCC TCT TGG ACC TTC TGT ATT CAG GTA ATG CCC TTG AAA GAT GCA GAG ACG
 261 R E F P S W T F C I Q **V** M P L K D A E T
 841 TAC AAA TGG AAT GTC TTT GAC GTG ACC AAA GTG TGG CCG CAC GGC GAC TAC CCA CTC ATC
 281 Y K W N V F D V T K V W P H G D Y P L I
 901 CCG GTC GGA AAA CTC GTG CTG GAT CGC AAC CCA GAA AAC TAT TTC CAA GAC GTG GAA CAA
 301 P V G K L V L D R N P E N Y F Q D V E Q
 961 GCA GCT TTT GCG CCA GCT CAT ATG GTG CCA GGG ATT GAA CCG AGC GAA GAT CGC ATG CTG
 321 A A F A P A H M V P G I E P S E D R M L
 1021 CAG GGA CGC ATG TTC TCC TAC ATC GAC ACT CAT CGG CAC AGA CTT GGC GCC AAT TAC CAT
 341 Q G R M F S Y I D T H R H R L G **A** N Y H
 1081 CAG ATT CCT GTG AAC CGC CCG TGG AAC GCC CGT GGG GGC GAC TAC TCC GTC CGC GAT GGT
 361 Q I P V N R P W N A R G G D Y S V R D G
 1141 CCA ATG TGC GTC GAC GGG AAC AAA GGG TCT CAG CTG AAT TAC GAA CCG AAC AGT GTG GAC
 381 P M C V D G N K G S Q L N Y E P N S V D
 1201 GGT TTT CCA AAG GAA GAC AGA AAT GCT GCT GTG TCG GGA ACG ACC ACA GTG AGT GGC ACG
 401 G F P K E D R N A A V S G T T T V S G T
 1261 GTC GCG TGC CAT CCT CAA GAG CAC CCC AAC AGT GAC TTT GAG CAG CCA GGG AAC TTT TAT
 421 V A C H P Q E H P N S **D** F E Q P G N F Y
 1321 AGA ACG GTC TTG AGT GAG CCG GAG AGG GAA GCG CTC ATT GGC AAC ATC GCC GAG CAT CTC
 441 R T V L S E P E R E A L I G N I A E H L
 1381 AGG CAG GCG AGA CGA GAT ATT CAA GAG CGA CAG GTG AAG ATT TTT TAC AAG TGC GAT CCA
 461 R Q A R R D **I** Q E R Q V K I F Y K C D P
 1441 GAG TAT GGC GAG CGC GTC GCT CGA GCC ATC GGT TTG CCG ACT GCG GCG TGC TAC CCA GCC
 481 E Y G E R V A R A I G L P T A A C Y P A
 1501 AAG ATG TAG 1509
 501 K M *

A

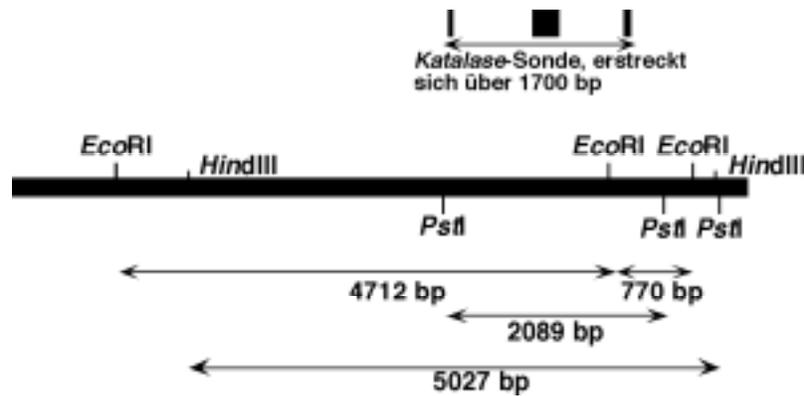


B

Exon (E)/Intron (I) Nr.	Erstreckt sich von bp bis bp	Länge bp
E1	1-117	117
I1	118-617	500
E2	618-677	60
I2	678-867	190
E3	868-936	69
I3	937-1574	638
E4	1575-1970	396
I4	1971-2836	866
E5	2837-3007	171
I5	3008-3647	640
E6	3648-3902	255
I6	3903-4686	784
E7	4687-4911	225
I7	4912-5545	634
E8	5546-5650	105
I8	5651-5992	342
E9	5992-6103	111

Abb. 4.2 A Schematische Darstellung der Exon/Intron Regionen des Katalase-Gens, im Maßstab; „E“ steht hier für Exon, symbolisiert durch schwarze Rechtecke, welche durch die Intron-Regionen, die durch schwarze Längsstriche dargestellt werden, getrennt sind. **B** Tabellarische Übersicht über die Größe der Exons/Introns bzw. der Bereich im Katalase-Gen, über den sie sich erstrecken.

A



B

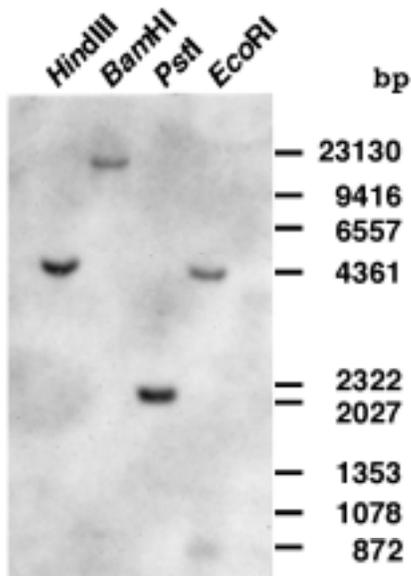


Abb 4.3 A Restriktionskarte des Katalase-Genlokus, die sich auf die für den *Southern Blot* (s. B) verwendeten Enzyme bezieht. Darüber ist die *Katalase*-Sonde eingezeichnet, die das Exon 7 sowie Teile von Exon 6 und 8 umfasst. Darunter ist die Größe der Restriktionsfragmente eingezeichnet. B Darstellung des *Southern Blots* mit der *T. gondii* Digoxigenin-markierte *Katalase*-Sonde; 5 µg genomische DNA von RHxgpr1 Tachyzoiten wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und auf ein Agarose-Gel geladen. Rechts daneben befindet sich der Größenstandard.

Der *Southern Blot* war für die Doktorarbeit noch einmal wiederholt worden und dient der Veranschaulichung des Gen-Lokus.

4.1.2 Alignment der *T. gondii* Katalase

Aufgrund der abgeleiteten Proteinsequenz wurde deutlich, dass es sich bei der *T. gondii* Katalase um eine typische Katalase handeln muss.

Die abgeleitete Proteinsequenz des *T. gondii* Katalase-Gens (AF161267) wurde in einem *alignment* (nach Jotun-Hein) mit bereits beschriebenen typischen Katalasen verglichen. Zum Vergleich herangezogen wurden folgende Katalasen:

Saccharomyces cerevisiae Katalase A, die peroxisomale der beiden Katalasen (X13028), *Nicotiana tabacum* Katalase (U93244), *Methanosarcina barkeri* Katalase (AJ005939), *Homo sapiens* Katalase (4557013), *Rattus norvegicus* Katalase (NP_036652), *Bacillus subtilis* Katalase (X85182).

Bei einem *blast* (GenBank) mit der *T. gondii* Katalase (*blastp*) erzielte die Katalase aus *R. norvegicus* die beste Übereinstimmung $P(N) 10^{-167}$ und wurde deshalb in den Sequenzvergleich mit einbezogen, Abb. 4.4.

Die *T. gondii* Katalase besitzt die sogenannte Kern-Region typischer Katalasen (Klotz et al., 1997); vorhanden sind auch das konservierte Histidin 64, welches an der Katalyse beteiligt ist, das Asparagin 137, das eine Rolle bei der Bindung des Substrates - H_2O_2 - spielt, das Serin 103 sowie der proximale Ligand des Häm-Eisens, Tyrosin 347. Die drei erstgenannten bilden zusammen mit anderen Resten den konservierten Hohlraum, in dem sich die prosthetische Gruppe, das Häm, verbirgt (Zamocky und Koller, 1999)

Die NADPH-Bindestellen, die in der bovinen Katalase nachgewiesen wurden (Fita und Rossmann, 1985; Hillar et al., 1994; Kitlar et al., 1994) sind ebenso hochkonserviert im abgeleiteten *T. gondii* Enzym, s. Abb. 4.4. Eine wichtige Aminosäure ist das Histidin 304 (Rinderleber Katalase), von dem angenommen wird, dass es stark mit NADPH wechselwirkt. Es befindet sich in der *Toxoplasma gondii* Katalase an der Position 294 (Zamocky und Koller, 1999). Die von Ossowski *et al.* beschriebene *active site* Konsensussequenz ist ebenfalls vorhanden (von Ossowski et al., 1993), Aminosäuren 53-69: (IF)X(RH)X₄(EQ)RX₂HX₂(GAS)-(GASTF)-(GAST); des weiteren die proximale Häm-Liganden Sequenz, Aminosäuren 343-351: R-(LIVMFSTAN)-F-(GASTNP)YXD(AST)-(QEH).

Außerdem findet man für die Interaktionen der einzelnen Untereinheiten wichtigen Aminosäuren: Leu-50, Asp-54, Phe-53, Asp-349, Arg-55 (Gouet et al., 1995) sowie das Prolin 59 (Bergdoll et al., 1997).

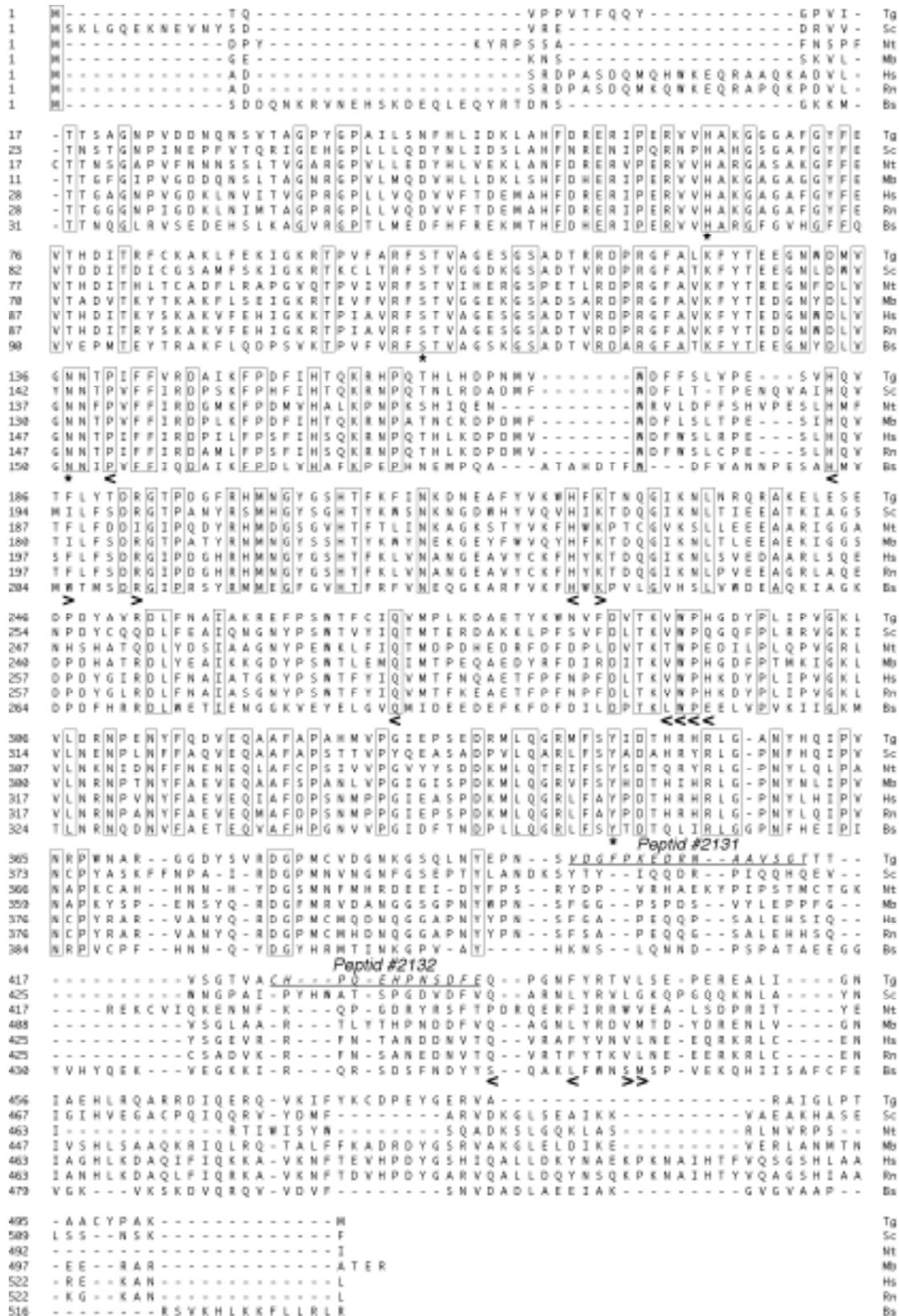


Abb. 4.4 Alignment diverser Katalasen: Mit einem * sind die konservierten Aminosäuren His-64, Ser-103, Asn-137 sowie Tyr-347 gekennzeichnet. Mit > sind die Aminosäuren gekennzeichnet, die hauptsächlich mit dem Adenin-Teil des NADPH, mit < sind die Aminosäuren gekennzeichnet, die hauptsächlich mit dem Nikotinamid-Teil des NADPH interagieren. Boxen indizieren, dass alle Aminosäuren an dieser Stelle übereinstimmen.

4.1.3 Northern Blot auf Tachyzoiten-RNA

Um festzustellen, ob das Katalase-Gen in *Toxoplasma* transkribiert wird und ob Spleißvarianten vorhanden sind, wurde ein *Northern Blot* durchgeführt. Die RNA wurde aus frisch lysierenden Tachyzoiten des RH-Stammes (RHhxgprt) präpariert und zwei verschiedene Konzentrationen auf ein 1 %-iges Agarose-Gel geladen: 5,5 bzw. 3,7 µg Gesamt-RNA. Die RNA wurde nach dem Gellauf auf eine Nylonmembran geblottet und mit der gleichen Dig-markierten *Katalase*-Sonde (DNA) (355 bp) hybridisiert wie der *Southern Blot*. Es wurde eine einzelne Bande detektiert mit einer Größe von ca. 2,8 kb.

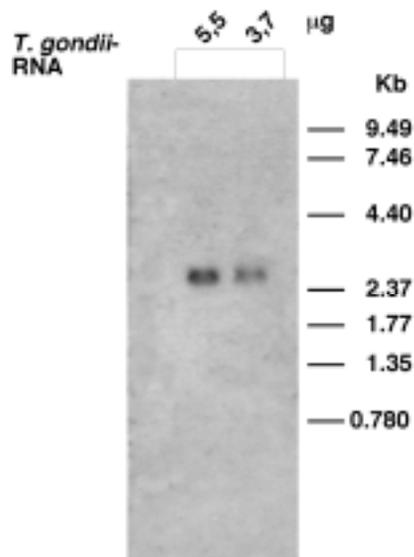


Abb. 4.5 5,5 bzw. 3,7 µg Gesamt-RNA wurden nach dem Gellauf auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer *Katalase*-Sonde von 355 bp hybridisiert.

Es wird ein einziges Transkript von etwa 2800 bp im *Northern Blot* detektiert.

4.1.4 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die *T. gondii* Katalase

Zur Charakterisierung der *T. gondii* Katalase wurden polyklonale Antikörper hergestellt. Hierfür wurden Kaninchen mit Peptiden immunisiert. Die Sequenzinformation für die Peptide wurde dem abgeleiteten Protein entnommen, allerdings war zu dieser Zeit nur die Sequenzinformation aus der Sequenzierung der ESTs bekannt, es handelte sich um 170 bp am C-Terminus. Da sich, wie in Abb. 4.4 zu erkennen ist, Katalasen am C-Terminus stärker voneinander unterscheiden, erwies sich die Wahl der Peptide aus dieser Region als vorteilhaft. Für die Auswahl waren zwei Dinge ausschlaggebend: Die Region, aus der das Peptid entnommen wurde, sollte an der Oberfläche des Proteins exponiert sein, damit also hydrophil; zur Ermittlung dieser Regionen wurde das Programm „Protean“, Unterprogramm von

DNASTAR/99, zu Hilfe genommen (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, s. Abb.4.6). Des Weiteren sollte das Peptid einer Region entnommen werden, an der sich die *T. gondii* Katalase stark von der humanen Katalase unterscheidet, um spätere Kreuzreaktionen mit Proteinen der Wirtszellen zu vermeiden. Die Peptide sind in Abb. 4.4 eingezeichnet und als # 2131 (IEP 4,36) sowie # 2132 (IEP 4,54) bezeichnet. Mit jedem Peptid wurden zwei Kaninchen, insgesamt also vier, immunisiert. Die interne Bezeichnung für die Kaninchen lautete #84 und #85, diese beiden wurden mit Peptid #2131 immunisiert (das Peptid hatte N-terminal zum Koppeln noch ein zusätzliches Cystein), sowie #96 und #97, diese beiden wurden mit dem Peptid #2132 immunisiert. Die Erstimmunisierungen wie auch die Folgeimmunisierungen wurden mit je 150 µg KLH-gekoppeltem Peptid durchgeführt, welches mit Freund'schem Adjuvants (komplett für Erstimmunisierung, inkomplett für Folgeimmunisierung) zu einer stabilen Emulsion verbunden worden war.

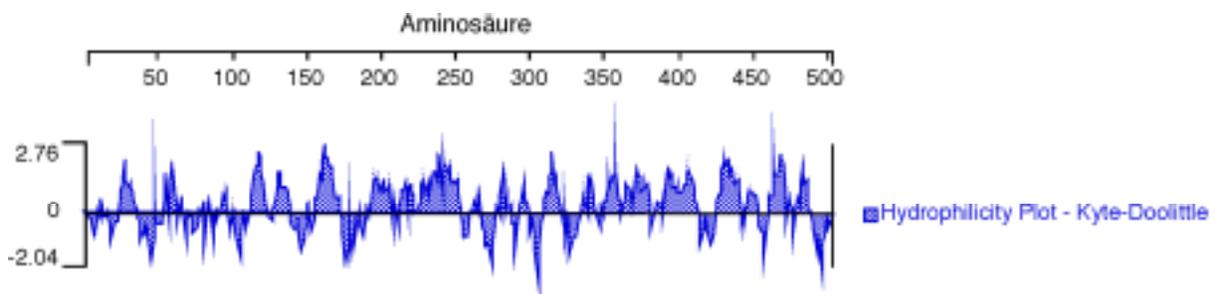


Abb. 4.6 Hydrophilicity Plot-Kyte-Doolittle, hier gezeigt für die gesamte *T. gondii* Katalase. Aus den hydrophilen Bereichen zwischen der Aminosäure 340 bis zum Stop-Codon wurden die Peptide ausgewählt, weil nur dieser Teil bereits sequenziert worden war. Zudem weist der C-Terminus von Katalasen eine geringere Homologie auf.

4.1.4.1 Charakterisierung der polyklonalen Antisera im Western Blot

Die in den Kaninchen hergestellten Anti-*T. gondii*-Katalase-Seren wurden in einem *Western Blot* auf ihre Spezifität getestet, bzw. es wurde geprüft, ob das Protein überhaupt exprimiert wird. Hierzu wurde ein 12 %-iges SDS-Gel mit Ripa-Lysat von Tachyzoiten des RH Stammes (RHxgprt) bzw. mit Ripa-Lysat von Vero Zellen beladen: Die Tachyzoiten (ca. 1×10^8) wurden von einem frisch lysierten 25 cm² Vero Fläschchen geerntet, gewaschen, und mit 50 µl Ripa-Lysat versetzt. 3 µl (ca. 6×10^6 Zellen) des nach der Zentrifugation entstehenden Überstandes wurden mit 1x Probenpuffer versetzt und auf eine Spur geladen. Ebenso behandelt wurde ein 25 cm² Fläschchen mit Vero Zellen, welches vor dem Waschschrift trypsinisiert wurde, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Durch das Beladen des Gels mit Wirtszell-Lysat sollte sichergestellt werden, dass die Seren nicht mit Proteinen aus Vero-

Zellen kreuzreagieren. Wäre dies der Fall, so könnten Verunreinigungen des Tachyzoiten-Lysats mit Wirtszellproteinen ein falsch positives Ergebnis erzeugen. Auf das Gel wurde alternierend Vero- und Tachyzoiten-Lysat geladen, das Gel nach dem Gellauf geblottet und je eine Vero-Lysat und eine Tachyzoiten-Lysat Spur mit einem der vier Seren, Verdünnung jeweils 1:1000, inkubiert.

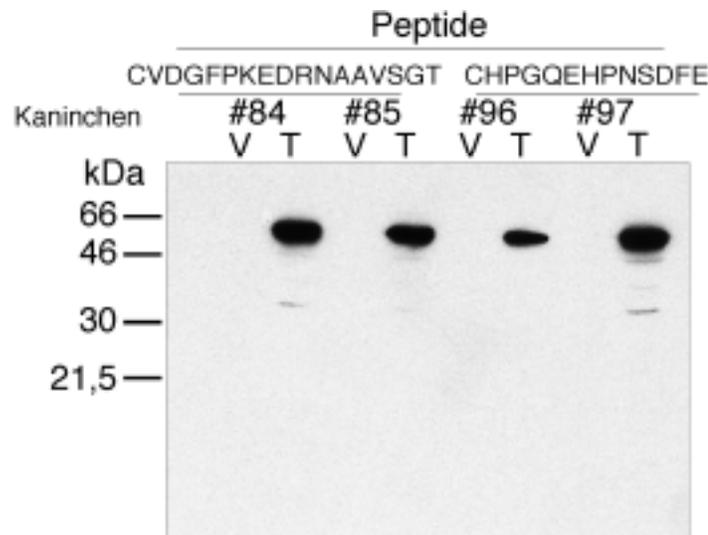


Abb. 4.7 *Western Blot* mit Tachyzoiten(T)- bzw. Vero(V)-Lysat. Je eine Spur mit Vero-Lysat und mit Tachyzoiten-Lysat wurde mit den jeweiligen anti-*T. gondii*-Katalase Seren, 1:1000 verdünnt, inkubiert. Verwendet wurde der *Rainbow Marker*. Im folgenden beziehen sich die Angaben #84, #85, #96 und #97, wenn nicht anders erwähnt, auf die Antiseren der Kaninchen mit der gleichnamigen Nummer.

Alle vier Antiseren erkannten eine Haupt-Bande zwischen 46 und 66 kDa, das vorhergesagte Molekulargewicht betrug 57,170 kDa. Die darunterliegenden Banden erscheinen nach längerer Exposition des Blots bei allen vier Seren und sind eventuell Abbauprodukte. Es war keine Kreuzreaktion mit den Wirtszellen zu sehen (Die Antiseren waren auch auf HFF Zellen getestet worden, ebenfalls mit negativem Ergebnis, Daten nicht gezeigt). Die Präimmunsereen zeigten bis zu Verdünnungen von 1:100 keine Reaktionen (nicht gezeigt).

4.1.4.2 Charakterisierung der polyklonalen Antiseren in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Die Seren sollten nun in der IFA getestet werden, um die Lokalisation der *T. gondii* Katalase in der Zelle festzustellen. Dies war um so wichtiger, als bis dahin noch keine Peroxisomen in Toxoplasma detektiert worden waren. Die *T. gondii* Tachyzoiten des RH Stammes wurden nach dem Waschen fixiert, wobei verschieden Fixierungsmethoden verwendet wurden, 4 % Paraformaldehyd, 4 % Paraformaldehyd/0,05 % Glutaraldehyd sowie Methanol. Die

Antikörper wurden 1:500 in Blockierungslösung verdünnt. Es ergab sich folgendes Bild der Lokalisation:

Serum	Verdünnung in der IFA	Lokalisation der Katalase innerhalb der Zelle
#84	1:500	Zytosolisch, außerdem wird eine Struktur detektiert, die mit dem Apicoplasten kolokalisiert
#85	1:500	Zytosolisch
#96	1:500	Zytosolisch, außerdem wird apikal eine perlschnurartige Struktur detektiert
#97	1:500	Zytosolisch

Obwohl alle vier Seren im *Western Blot* das selbe Muster zeigten, verhielten sie sich in der Immunfluoreszenz uneinheitlich.

Erwähnt werden muss, dass auch das Zytosol nicht in allen Vakuolen gefärbt war, sondern nur in einigen, dann aber waren alle Parasiten in der Vakuole einheitlich gefärbt. Dieses Phänomen trifft auf alle vier Seren gleichermaßen zu. Auch unterschied sich die Intensität der zytosolischen Färbung, egal welche Fixierung gewählt wurde, und sollte deshalb kein Fixierungsartefakt sein. Außergewöhnlich war außerdem, dass die Seren #85 und #97, die aus Immunisierungen mit unterschiedlichen Peptiden stammten, die gleiche Färbung der Zelle, nämlich nur zytosolisch, aufwiesen, wohingegen die Seren #84 und #96 ebenfalls das Zytosol, zusätzlich aber noch unterschiedliche apikale Strukturen anfärbten, wobei es sich bei Serum #84 wahrscheinlich um den Apicoplasten, ein erst kürzlich beschriebenes Organell (Fichera und Roos, 1997) handelte, was durch Färbung der Apicoplasten-DNA mit DAPI (welches interkaliert) kenntlich gemacht wurde. Die zytosolische, darüberhinaus zellzyklus-abhängige Expression einer Katalase erschien unwahrscheinlich.

Gezeigt werden soll hier - stellvertretend für alle anderen Seren, die gegen die *T. gondii* Katalase hergestellt wurde - die Färbung von Toxoplasmen mit Serum #84.

Hier ist deutlich zu erkennen, dass in allen Zellen eine apikale Struktur, die mit dem Apicoplasten kolokalisiert (DAPI hier nicht gezeigt, siehe aber Abb. 4.12), gefärbt ist, einige Vakuolen jedoch auch zytosolisch gefärbt sind.

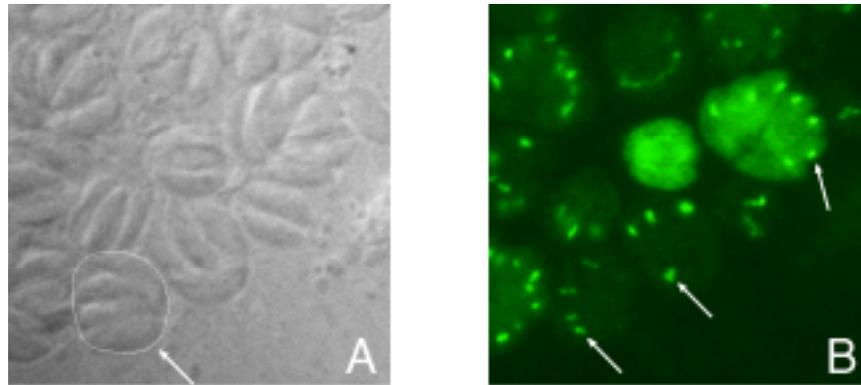


Abb. 4.8 HFF (Human Foreskin Fibroblast)-Zellen wurden mit Tachyzoiten des RH Stammes (RHhxgprt) infiziert **A** Dic (Differential interference contrast) Aufnahme von **B**, auf der mehrere Vakuolen zu sehen sind. Der weiße Pfeil zeigt auf eine Vakuole mit vier Parasiten, die zur besseren Veranschaulichung weiß umrandet wurde. **B** Gezeigt ist die indirekte Immunfluoreszenz mit dem Serum #84, welches 1:500 in Blockierungslösung verdünnt wurde, als Sekundärantikörper wurde Alexa 488-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak verwendet. Die weißen Pfeile deuten auf die apikal detektierte Struktur, die mit dem Apicoplasten kolokalisiert.

Die zytosolische Färbung ist besonders stark in der Vakuole mit 4 bzw. in der Vakuole mit 8 Parasiten zu sehen. Dazwischen gibt es Abstufungen in der Intensität der Zytosol-Färbung, jedoch besitzen alle Parasiten innerhalb einer Vakuole die selbe Intensität. Immunfluoreszenzen mit den Seren #85 bzw. #97 sehen genauso aus, nur dass keine apikalen Strukturen detektiert werden. Das Serum #96 führt auch zu einer apikalen, sich jedoch von Serum #84 unterscheidenden, perlschnurartigen Färbung,

Der Nachweis von Peroxisomen mit den Seren #84 und #96 durch Immun-Elektronenmikroskopie (Dr. David Ferguson, Universität Oxford, Dr. Jean-Francois Dubremetz, Universität Lille) war zwei mal unabhängig nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

4.1.5 Fraktionierung von *T. gondii* RH Tachyzoiten zur subzellulären Lokalisation der *T. gondii* Katalase

Nachdem die Immunfluoreszenzen mit den vier Anti-*T. gondii*-Katalase Seren keine eindeutigen Aussagen über die Lokalisation des Proteins zuließen, wurden Tachyzoiten des RH Stammes (RHhxgprt) verschiedenen Fraktionierungsmethoden unterzogen.

4.1.5.1 Fraktionierung von Toxoplasmen mit Digitonin

Diese Methode der Zellfraktionierung beruht auf der Permeabilisierungseigenschaft von Digitonin abhängig vom Cholesteringehalt einer Membran: Plasmamembranen werden

aufgrund ihres höheren Cholesteringehalts durch bestimmte Digitoninkonzentrationen permeabilisiert, bei denen die Membranen von Organellen noch intakt bleiben. Dies sollte die Fraktionierung von Toxoplasmen in eine zytosolische und eine grobe peroxisomale Fraktion erlauben. Verwendet wurden Tachyzoiten des RH Stammes (*RHhxgprt*) aus einer frisch lysierten 25 cm² Vero Kultur-Flasche. Behandelt wurden die Zellen mit 5 verschiedenen Ausgangskonzentrationen Digitonin, namentlich 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 und 0,5 mg Digitonin pro ml DMF (es wurden auch Konzentrationen von 0,6, 0,7, 0,75, 1, 1,25 mg Digitonin/ml DMF getestet). Für Trypanosomen ist eine Konzentration von 1 mg/ml ausreichend, um die Plasmamembran zu öffnen, die Glykosomenmembran jedoch nicht zu zerstören. Die nach der Zentrifugation resultierenden Pellet- und Überstand-Fractionen wurden in 2x Probenpuffer auf ein 12 % iges SDS-Gel geladen, geblottet und mit dem Serum #96 (im *Western Blot* verhielten sich ja alle Seren gleich) inkubiert. Als Kontroll-Antikörper wurde Anti-*T. gondii*-GRA3 verwendet (Lerliche und Dubremetz, 1991), welches das Dichte Granula Protein 3 erkennt und damit als Markerprotein für die Intaktheit des Organells (und somit der Organellen allgemein) dient, sowie der Anti-*Dictyostelium discoideum*-Aktin Antikörper, welcher mit dem *T. gondii* Aktin kreuzreagiert und als zytosolischer Marker verwendet wurde. Allerdings stellte es sich erst einige Zeit später (Keith Joiner, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA, persönliche Mitteilung) heraus, dass GRA3, das in der Literatur als lösliches Protein beschrieben wird (Ossorio et al., 1994), eine Transmembrandomäne besitzt und deshalb wahrscheinlich keinen genauen Aufschluß über die Intaktheit des Organells geben kann.

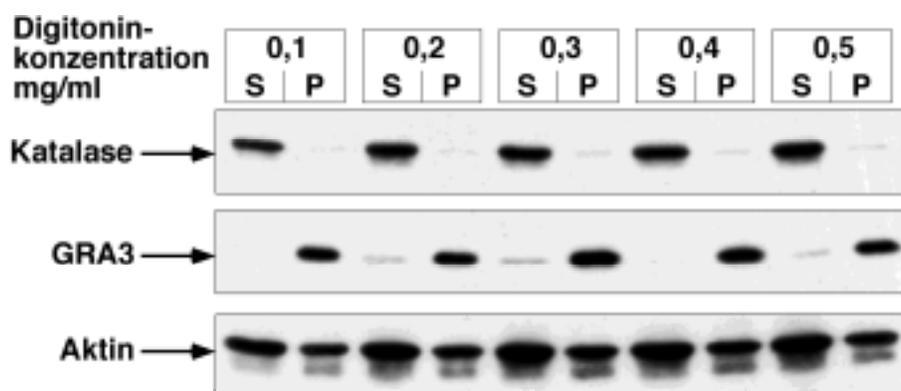


Abb. 4.9 Digitonin-Fraktionierung von *T. gondii* Tachyzoiten. (*RHhxgprt*). 5 verschiedene Ausgangskonzentrationen Digitonin (0,1-0,5 mg/ml Digitonin in DMF) wurden verwendet, um frisch lysierende Parasiten zu fraktionieren. Die resultierenden Überstände (S) und Pellets (P) wurden in Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel geladen. Nach dem Blotten wurde die Membran zunächst mit Anti-*T. gondii*-Katalase Serum inkubiert (#96, 1:1000), gestrippt, mit Anti-*T. gondii*-GRA3 Antikörper (1:1000) inkubiert, gestrippt, und zuletzt mit Anti-*D. discoideum*-Aktin Antikörper (1:1000) inkubiert.

Die Katalase ist fast nur in den Überstandsfractionen zu finden, was auf eine zytosolische Lokalisation hinweist, wohingegen GRA3 fast nur in den Pelletfraktionen zu finden ist; durch die beschriebene Problematik mit der Transmembrandomäne ist keine klare Aussage machbar, ob die Dichten Granula noch intakt sind. Dies kann jedoch nicht von der Tatsache ablenken, dass die Katalase fast nur in den Überstandsfractionen zu finden ist. Aktin, das Markerprotein für das Zytosol, befindet sich in beiden Fraktionen, was eventuell daran liegt, dass es mit zytoskelettalen Elementen assoziiert.

4.1.5.2 Mechanischer Aufbruch der Toxoplasmen mit *glass beads* und anschließende Fraktionierung

Die frisch lysierenden *T. gondii* Tachyzoiten (Vero Kulturschale 150x20 mm) wurden nach dem Waschen mit dem MINI-BEADBEATER™ und Glaskugeln mechanisch aufgebrochen. Nach einigen Zentrifugationsschritten erhielt man ein Organell-Pellet, das auf einen Saccharosegradienten geladen und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert wurde. Der Gradient wurde in kreisenden Bewegungen von oben nach unten in in 330 µl Schritten abgenommen und TCA präzipitiert, in Probenpuffer aufgenommen und anschließend eine Hälfte hiervon auf ein Gel geladen und mit Anti-*T. gondii*-Katalase Serum (#96, 1:1000) inkubiert. Nach dem Strippen wurde der *Blot* mit Anti-*T. gondii*-GRA3 Antikörper (1:1000) inkubiert.

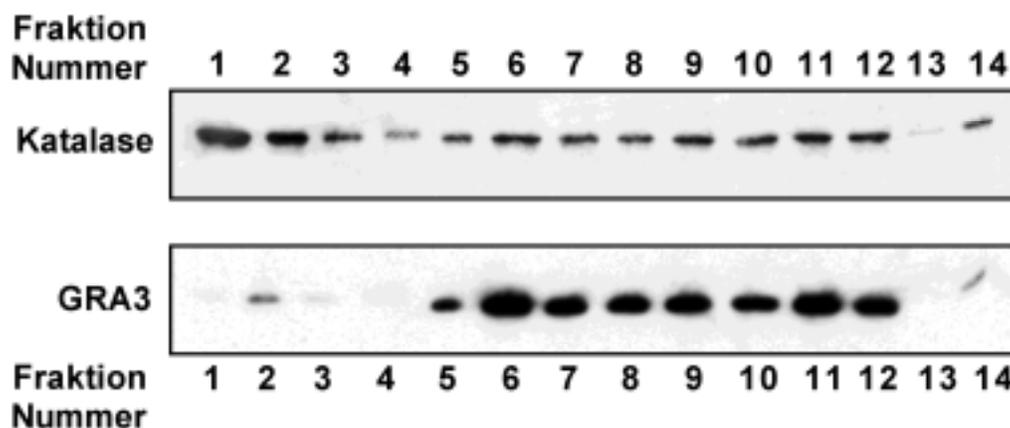


Abb. 4.10 Fraktionierung mechanisch aufgebrochener *T. gondii* Tachyzoiten. Die insgesamt 14 resultierenden Fraktionen wurden nach einer TCA-Präzipitation in 2x Probenpuffer aufgenommen. Die Hälfte hiervon wurde auf ein 12 % iges SDS-Gel geladen und nach dem *Blotten* zunächst mit Anti-*T. gondii*-Katalase Serum (#96, 1:1000) inkubiert, nach dem Strippen wurde mit Anti-*T. gondii*-GRA3 Antikörper (1:1000) inkubiert.

Die Katalase befindet sich in den leichteren Fraktionen (die sich links befinden, 1 bezeichnet die leichteste Fraktion), die zytosolische Proteine darstellen bzw. Proteine, die durch das

Beschädigen eines Organelles ausgetreten sind, aber auch in den dichteren Fraktionen. GRA3 hingegen befindet sich hauptsächlich in den dichteren Fraktionen.

Aus den mit den Fraktionierungen gewonnenen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass die Katalase zytosolisch lokalisiert ist. Durch den *Southern Blot* wurde deutlich, dass es sich bei der *Katalase* vermutlich um ein Einzelkopie-Gen handelt. In Eukaryonten wurden bereits zytosolische Katalasen beschrieben (Eckelt et al., 1998), es existierte dann jedoch häufig auch eine peroxisomale Katalase (Garcia et al., 2000; Izawa et al., 1996; Taub et al., 1999). Da die Anti-*T. gondii*-Katalase Seren alle die gleiche Bande im *Western Blot* zeigten, in der Immunfluoreszenz jedoch unterschiedliche Färbungen aufwiesen, sollten die Antikörper mittels der Peptide aufgereinigt werden.

4.1.6 Aufreinigung der Anti-*T. gondii*-Katalase Seren mittels der dazugehörigen Peptide

Die Fraktionierungsergebnisse sprachen für eine zytosolische Lokalisation der Katalase. Da die vier gegen die *T. gondii* Katalase hergestellten Antiseren in der Immunfluoreszenz unterschiedliche Strukturen erkannten, im *Western Blot* jedoch eine Bande zwischen 46 und 66 kDa detektierten, sollten die Antikörper aufgereinigt werden, um mehr Klarheit zu bekommen. Verwendet wurde hierfür die Affi-Gel® 15 Gel Matrix, die leicht positiv geladen ist und sich daher besonders zur Kopplung von Peptiden/Proteinen mit einem IEP < 6,5 eignet. Das Peptid wird kovalent über eine Amidbindung an die Matrix gekoppelt. Zur Aufreinigung der Seren #84 und #85 wurden Säulen hergestellt, bei denen das Peptid #2131 an die Matrix gekoppelt wurde, zur Aufreinigung der Seren #96 und #97 wurden Säulen hergestellt, bei denen das Peptid #2132 an die Matrix gekoppelt wurde. Anschließend wurden Matrix und gekoppeltes Peptid mit Blockierungspuffer blockiert. Je ca. 2 ml Serum wurden auf die Säule gegeben und über Nacht inkubiert. Hierbei sollten die für das Peptid spezifischen Antikörper binden können, die nichtspezifischen Antikörper sollten ungekoppelt bleiben. Nach der Inkubation wurde der Durchlauf der Säule aufgefangen, er enthält die nichtgebundenen (unspezifischen) Antikörper. Anschließend wurde die Säule mit TBS gewaschen, um danach die Antikörper mit je 2 ml 0,1 M Glycin, pH 2,5, zu eluieren; es wurden fünf bis sechs Fraktionen à ca. 500 µl gesammelt. Die Antikörper wurden neutralisiert und der Erfolg der Aufreinigung sollte im *Western Blot* auf Toxoplasmen-Lysat getestet werden.

4.1.6.1 Analyse der gereinigten Anti-*T. gondii*-Katalase Seren im *Western Blot*

Die gereinigten Anti-*T. gondii*-Katalase Seren wurden im *Western Blot* überprüft.

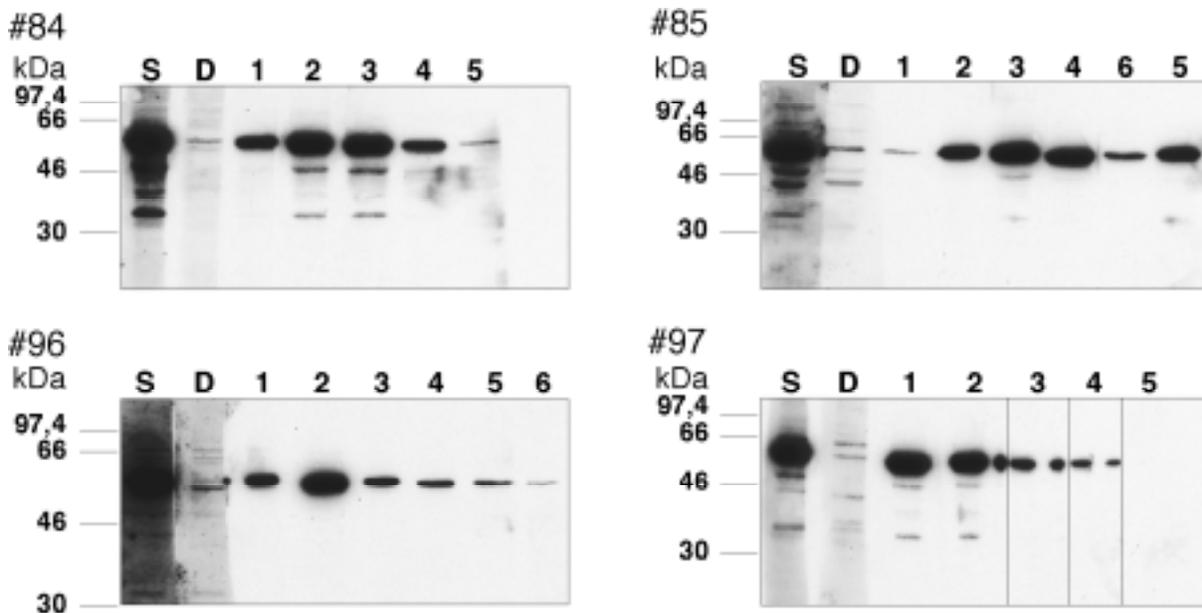


Abb 4.11 Test der aufgereinigten Anti-*T. gondii*-Katalase-Seren im *Western Blot* auf RHhxgprt Ripa-Lysat. Je Spur wurden 2 μ l Ripa-Lysat, entsprechend 4×10^6 Zellen, auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen, als Marker diente der *Rainbow Marker*. Nach dem Blotten wurden die Spuren auseinandergeschnitten und mit dem nicht gereinigten Serum (S), dem Durchlauf (D), der die unspezifischen Antikörper enthalten sollte, und den gesammelten, gereinigten Fraktionen (1 - 5 bzw. 1 - 6) inkubiert. Die Verdünnung betrug in allen Fällen 1:1000.

Im Durchlauf sind Banden zu erkennen, bei denen es sich um die Epitope handelt, die von Antikörpern erkannt werden, die nicht an die Peptide gebunden haben. Die gereinigten Fraktionen mit Antikörpern detektieren wie zuvor ein Protein zwischen 46 und 66 kDa. Bei den Banden handelt es sich eventuell um Degradationen, sie sind auch deshalb stärker zu sehen, weil ein Film mit höherer Expositionszeit gewählt wurde, um Proteinbanden gut erkennbar zu machen, die vom Durchlauf detektiert werden. Die Signale, die man mit dem ursprünglichen, ungereinigten Serum erhält, setzen sich aus der Summe der Banden des Durchlaufs und der gereinigten Fraktionen zusammen. Die Intensität der Hauptbande ist mit dem nicht-gereinigten Serum ungleich stärker als in den gereinigten Fraktionen. Bei dem *Blot*, der mit dem #97 Serum inkubiert wurde, wurden die Spuren nicht genau geschnitten, deshalb wurden Längsstriche eingezeichnet, um die tatsächliche Spur kenntlich zu machen.

Da die Aufreinigung erfolgreich war, sollten die Antikörper nun nochmals in der IFA getestet werden, um die Lokalisation der Katalase innerhalb der Zelle festzustellen und die widersprüchlichen Ergebnisse mit den ungereinigten Seren aufzuklären.

4.1.6.2 Analyse der gereinigten Anti-*T. gondii*-Katalase Seren in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse

Da die Seren durch die Aufreinigung nur noch spezifische Antikörper enthalten sollten, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt, um die *T. gondii* Katalase innerhalb der Zellen zu lokalisieren. Durch das Aufreinigen der Antikörper sollten alle Seren die selben Strukturen innerhalb der Zelle erkennen. Nach dem Aufreinigen der Seren war die zellzyklus-abhängige zytosolische Färbung fast verschwunden. Mit den Seren #85 und #97 war selbst mit einer Verdünnung von 1:100 nur mehr ein diffuses zytosolisches Signal zu sehen. Auch bei der Verwendung der gereinigten Seren #84 und #96 war, allerdings hier mit einer Verdünnung von 1:500, nur ein schwaches zytosolisches Signal detektierbar. Die apikalen Strukturen wurden weiterhin detektiert.

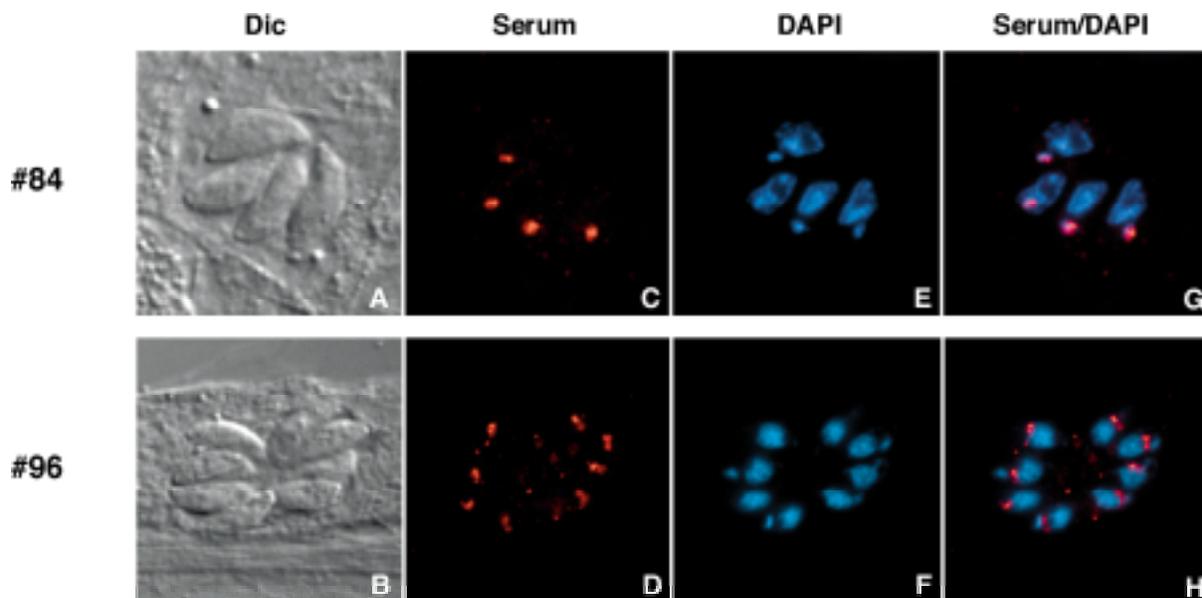


Abb 4.12 HFF-Zellen wurden mit Tachyzoiten infiziert (*RHxgprt*). Indirekte Immunfluoreszenz-analyse mit den gereinigten Seren #84 (A,C,E,G) und #96 (B,D,F,H). Die zuvor schon beschriebenen, mit Serum #84 (C) bzw. mit Serum #96 (D) detektierten apikalen Strukturen, waren immer noch deutlich zu erkennen (Verdünnung 1:500, sek. Antikörper Alexa 594-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak). A und B zeigen das dazugehörige Dic Bild von C und D. In A ist eine Vakuole mit 4 Parasiten, in B eine Vakuole mit 8 Parasiten zu sehen. C und D zeigen die indirekte Immunfluoreszenz mit den Seren #84 und #96, E und F die korrespondierende Färbung mit DAPI. G und H zeigen die Überlagerung von C und E bzw. D und F.

Es wird deutlich, dass die apikale Struktur, die von Serum #84 erkannt wird, mit dem Apicoplasten kolokalisiert (G). Bei der perlschnurartigen Struktur, die von Serum #96 erkannt wird, handelt es sich nicht um den Apicoplasten, sondern um eine benachbarte Struktur.

4.1.7 Native PAGE (Anodisches diskontinuierliches Polyacrylamidgelelektrophoresesystem)

Nachdem sich die Antikörper in der Immunfluoreszenzanalyse selbst nach der Aufreinigung unterschiedlich verhalten hatten, im *Western Blot* jedoch nicht zu unterscheiden waren und identische Banden erzeugten, wurde ein natives Gel gemacht. Zwar werden die Proteine in der IFA fixiert, sind aber dennoch eher in einem nativen Zustand. In der SDS-PAGE hingegen werden die Proteine reduziert und denaturiert. Dies könnte ein Grund für das unterschiedliche Verhalten der Seren mit beiden Methoden sein. Das native Gel, das ohne SDS und reduzierende Agenzien auskommt, sollte daher eher die Konformation der Proteine in der IFA widerspiegeln. Denkbar wäre, dass mit den Seren #84 und #96 zusätzliche Banden erscheinen, da in der IFA verschiedene Epitope erkannt werden. Für diesen Versuch wurde die Hälfte einer frisch lysierten 75 cm² Vero Flasche mit RH*hxprt*⁻ Parasiten verwendet, als negative Kontrolle wurde das Pellet eines konfluenten Vero 25 cm² Schälchens verwendet. Die Pellets wurden geteilt und entweder in 150 µl PBS oder in 150 µl PBS/0,2 % Triton X-100 resuspendiert. Der Teilversuch mit dem Triton X-100 diente dazu, den Aufschluß der Zellen auch wirklich zu sicher zu stellen, falls die Sonifizierung nicht ausreicht. Allerdings besteht durch das Triton X-100 auch die Gefahr, die Proteine nicht in nativer Konformation zu erhalten. Der Aufschluß erfolgte mittels Sonifizierung, es schloß sich ein Zentrifugationsschritt an. Die Überstände wurden anschließend auf native und SDS-Gele geladen.

Letztere dienten als positive Kontrolle, ob die Proben auch richtig vorbereitet worden waren.

Bei den nativen Gelen handelte es sich um ein anodisches diskontinuierliches Polyacrylamidgelelektrophoresesystem, das sich für saure und neutrale Proteine eignet (die Katalase hat einen Isoelektrischen Punkt (IEP) bei pH 7,01). Ein Marker wurde für die nativen Gele nicht verwendet, weil hier das Laufverhalten von verschiedenen Parametern abhängig ist.

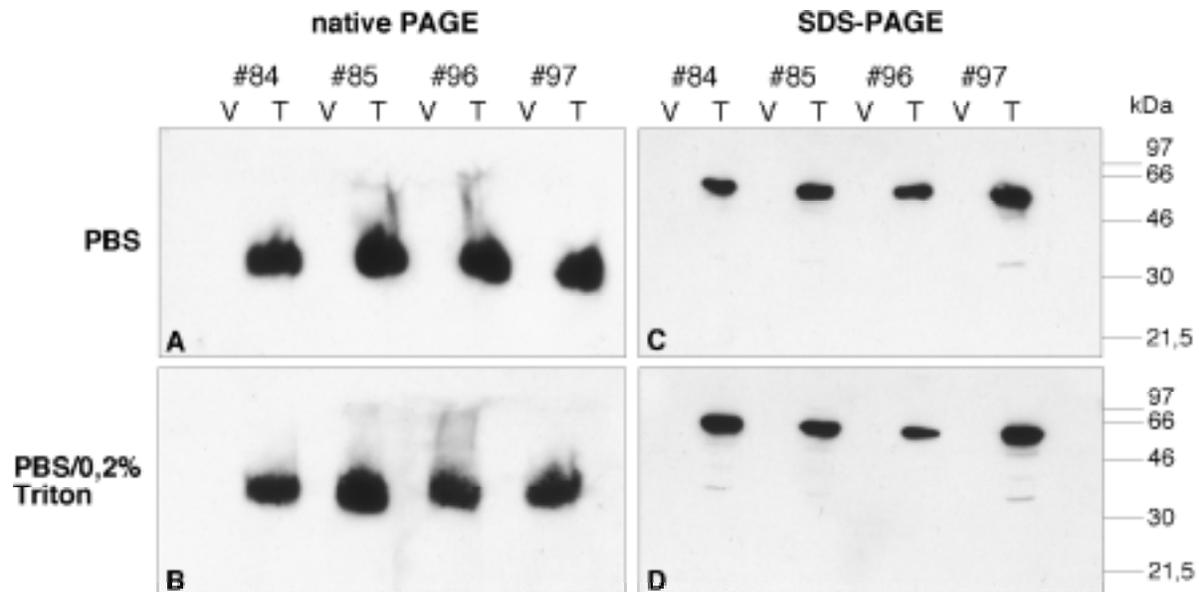


Abb. 4.13 SDS-PAGE und native PAGE. Je 60 μ l des resultierenden Überstandes nach dem Zentrifugieren (ca. 150 μ l in PBS bzw. PBS/0,2% Triton und Proteaseinhibitoren) wurden in nativem Probenpuffer aufgenommen, **A** und **B** (Endvolumen 160 μ l), 60 μ l wurden in normalem 1x Probenpuffer aufgenommen **C** und **D** (Endvolumen 160 μ l). Je Mix wurden pro Spur 30 μ l aufgeladen.

A und **B** zeigen die beiden nativen Gele, die Zellpellets waren entweder in PBS allein (**A**) oder aber in PBS/0,2 % Triton X-100 (**B**) aufgenommen worden. **C** und **D** zeigen die Kontrollen, hier wurden die Homogenate von **A** und **B** auf SDS-Gelen aufgetrennt. V: Vero-Zellen Homogenat; T: Toxoplasmen-Tachyzoiten Homogenat. Je eine Spur Vero- und eine Spur Toxoplasmen-Homogenat wurden mit den vier verschiedenen Seren inkubiert (1:1000 verdünnt, gereinigte Antikörper). Der (*Rainbow*-) Marker bezieht sich nur auf die SDS-PAGEs.

Die beiden *Blots* **C** und **D** zeigen das gleiche Muster wie schon der *Western Blot* (s. Abb. 4.7). Die beiden *Blots* **A** und **B** zeigen, unabhängig vom Puffer, in dem die Pellets resuspendiert wurden, das gleiche Muster, d.h. eine Bande auf der selben Höhe mit allen vier Seren. Zusätzliche Banden wurden nicht detektiert. Vero Proteine wurden durch die Antikörper nicht erkannt.

Es erschien relativ unwahrscheinlich, dass die Katalase im Apicoplast lokalisiert ist, weil hierzu ein zweiteiliges Signal am N-Terminus notwendig ist, und zwar für den sekretorischen Weg, gefolgt von einem Chloroplasten-Signal (Waller et al., 1998). Dieses Signal existiert jedoch nicht in der *T. gondii* Katalase. Deshalb erschien die apikale Struktur, die von Serum #96 detektiert wird, ein möglicher Kandidat für ein Peroxisom. Es wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit Markern von bereits beschriebenen Organellen und dem Serum #96 gegen die *T. gondii* Katalase gemacht, um zu überprüfen, ob es sich um eine neue, noch nicht beschriebene Struktur handelt.

4.1.8 Doppelimmunfluoreszenzanalyse mit Serum #96 und monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen Markerproteine von sekretorischen *T. gondii* Organellen

Um sicherzustellen, dass es sich bei der von Serum #96 detektierten apikalen Struktur, die einen möglichen Kandidaten für ein Peroxisom darstellte, um ein noch nicht beschriebenes Organell handelt, wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit mAK gegen Markerproteine von sekretorischen Organellen durchgeführt: MIC3 für die Mikronemen (Achbarou et al., 1991), GRA3 für die Dichten Granula (Lerich und Dubremetz, 1991) sowie ROP1 für die Rhoptrien (Beckers et al., 1994). Es handelte sich um monoklonale (m) Antikörper (AK) aus Mäusen, so dass eine Doppelimmunfluoreszenz mit dem Anti-*T. gondii*-Katalase Serum möglich war.

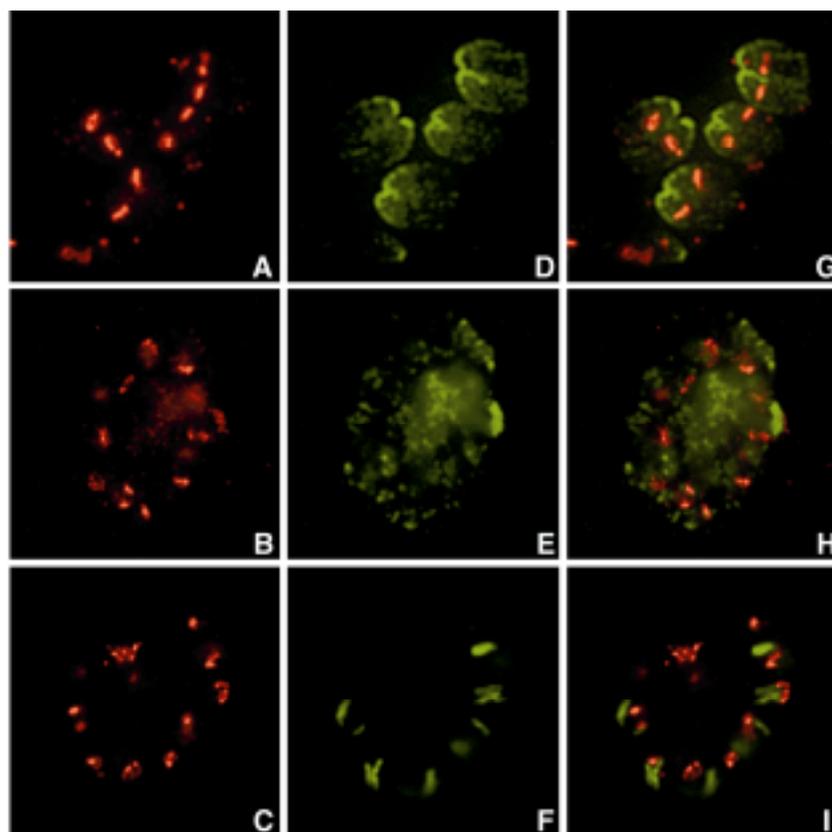


Abb. 4.14 HFF, die mit RH Tachyzoiten (*RHxgprt*) infiziert worden waren, wurden mit 4 % Paraformaldehyd/0,05 % Glutaraldehyd 15 min fixiert. Die Fixierung für die Dichte Granula IFA erfolgte für 10 min mit 3 % Paraformaldehyd. A, B und C zeigen die Färbung der Tachyzoiten mit Serum #96, 1:500 verdünnt (rot); D, E und F zeigen die gleichen Zellen mit den entsprechenden mAK gegen die Organellmarker, 1:1000 verdünnt (grün) (sekundäre AK Alexa 594-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak (rot) bzw Alexa 488-konjugierter Ziege- α -Maus-Ak (grün)). Bei Bild G handelt es sich um die Überlagerung der Bilder A und D, bei H um B und E und bei I um C und F.

Es zeigte sich, dass die mit Serum #96 detektierte, apikale Struktur nicht mit Mikronemen, Dichten Granula oder Rhoptrien kolokalisiert.

4.1.9 Verwendung des Serums #96 in der IFA mit dem Prugniald-Stamm

Der persistierende *T. gondii* Prugniald-Stamm, der in der Lage ist, Zysten *in vitro* zu formen, wurde verwendet um die Lokalisation der Katalase in Bradyzoiten mit dem Serum #96 zu untersuchen. Bradyzoiten konnten anhand eines spezifischen Antigens, SAG4 (Odberg-Ferragut et al., 1996) identifiziert werden, für dessen Detektion ein monoklonaler Antikörper aus der Maus verwendet wurde. Die Fixierung war 4 % Paraformaldehyd/0,05 % Glutaraldehyd.

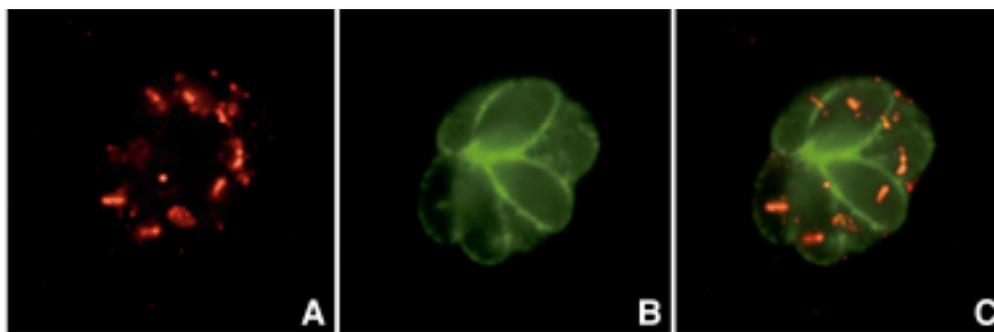


Abb. 4.15 Lokalisation der Katalase mit dem gereinigten Serum #96 in Bradyzoiten. HFF Zellen wurden mit Parasiten des Prugniald-Stammes infiziert. Bild B zeigt eine Zyste, die mittels des Antikörpers gegen SAG4 sichtbar gemacht wurde (grün). A zeigt dieselbe Zyste mit dem Rotfilter, unter dem die Färbung mit dem gereinigten Serum #96 sichtbar wird. Das gereinigte Serum #96 wurde 1:500, der Anti-SAG4 Antikörper 1:1000 verdünnt; sekundäre AK Alexa 594-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak (rot) bzw. Alexa 488-konjugierter Ziege- α -Maus-Ak (grün). C zeigt die Überlagerung aus A und B.

Die vom Serum #96 gefärbte Struktur in Bradyzoiten gleicht der in Tachyzoiten des RH Stammes (s. Abb 4.12. D), also einer perlschnurartigen Struktur.

4.1.10 Lokalisation von GFP-PTS1 Fusionsproteinen in *T. gondii*

Da außer der Katalase keine weiteren peroxisomalen Proteine in der *T. gondii* EST-Datenbank gefunden wurden, wurden GFP-PTS1 (*P*eroxisomal *T*argeting *S*ignal) Fusionsproteine hergestellt. Zunächst handelte es sich hierbei um ein Fusionsprotein, welches C-terminal mit dem Tripeptid –AKM endet, wie auch die *T. gondii* Katalase. Außerdem wurde ein GFP-Konstrukt hergestellt, das am C-Terminus aus den 12 C-terminalen Aminosäuren der *T. gondii* Katalase besteht (9 AS + AKM). Der Grund für diese zusätzliche Sequenz zum –AKM war die Möglichkeit, dass sich in den weiter N-terminal liegenden Sequenzen noch Sequenzinformationen für den Import in Peroxisomen befinden könnten

(Blattner et al., 1992; Mullen et al., 1997; Mullen et al., 1997; Purdue et al., 1996). Außerdem wurde ein GFP-Fusionsprotein aus GFP und dem Tripeptid –SKL am C-Terminus hergestellt, weil es sich hierbei um ein kanonisches Signal für den Import in Peroxisomen handelt. GFP-GPSKL bedeutet, dass noch zwei Aminosäuren vor –SKL eingeführt wurden, als Helixbrecher. Dies sollte keine negativen Auswirkungen auf den Import haben (McNew und Goodman, 1994). Transfiziert wurden je 5×10^7 RH-Tachyzoiten (*RHhxgprt*⁻) mit 80 µg Vektor, die Selektion erfolgte mittels Mycophenolsäure (MPA) und Xanthin und wurde möglich durch das auf dem Vektor liegende HXGPRT-Gen.

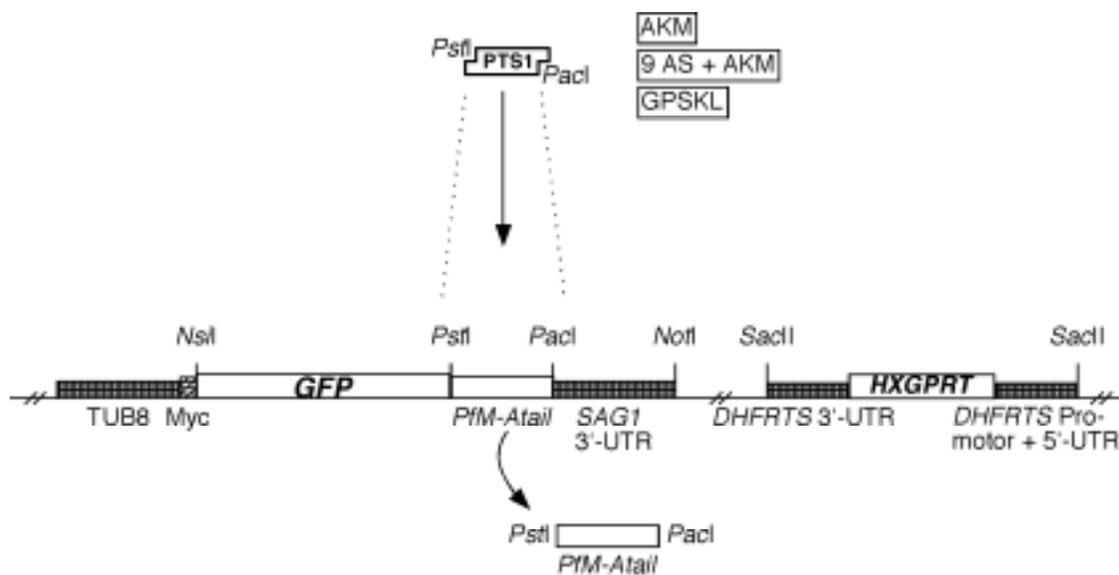


Abb. 4.16 Schematische Darstellung der für GFP-PTS1 kodierenden Vektoren. Als Vektor diente pTUB8MycGfPPfMtail (Hettmann, 2000). Durch Schneiden mit den Enzymen *Pst*I und *Pac*I wurde eine für einen Plasmodium-Myosinschwanz kodierende Region herausgeschnitten und durch die PTS-1 Signal *Inserts* ersetzt, die durch *primer*-Hybridisierung entstanden waren: AKM durch cz989/990 (resultierender Vektor **pHD1035**), 9 AS + AKM durch cz1005/cz1006 (resultierender Vektor **pHD1000**) und GPSKL durch cz1231/cz1232 (resultierender Vektor **pHD1001**).

Bei dem Promotor TUB8 handelt es sich um einen chimären *SAG1/TUB1*-Promotor aus 5x*SAG1-repeats* fusioniert mit dem deletierten *Tubulin 1* Promotor pT/70 nach Soldati und Boothroyd (Soldati und Boothroyd, 1995). Die 3'-flankierende Sequenz stammt von *SAG1*. Zusätzlich trägt das Plasmid noch den ColE1-Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli* und das β -Laktamase-Gen. Der *HXGPRT*-Selektionsmarker steht unter der Kontrolle des *T. gondii Dihydrofolat-Reduktase-Thymidilat-Synthase (DHFRS)*-Promotors.

Transfiziert wurden je 5×10^7 RH-Tachyzoiten (*RHhxgprt*⁻) mit 80 µg Vektor, die Selektion erfolgte mittels MPA und Xanthin und wurde möglich durch das auf dem Vektor liegende HXGPRT-Gen.

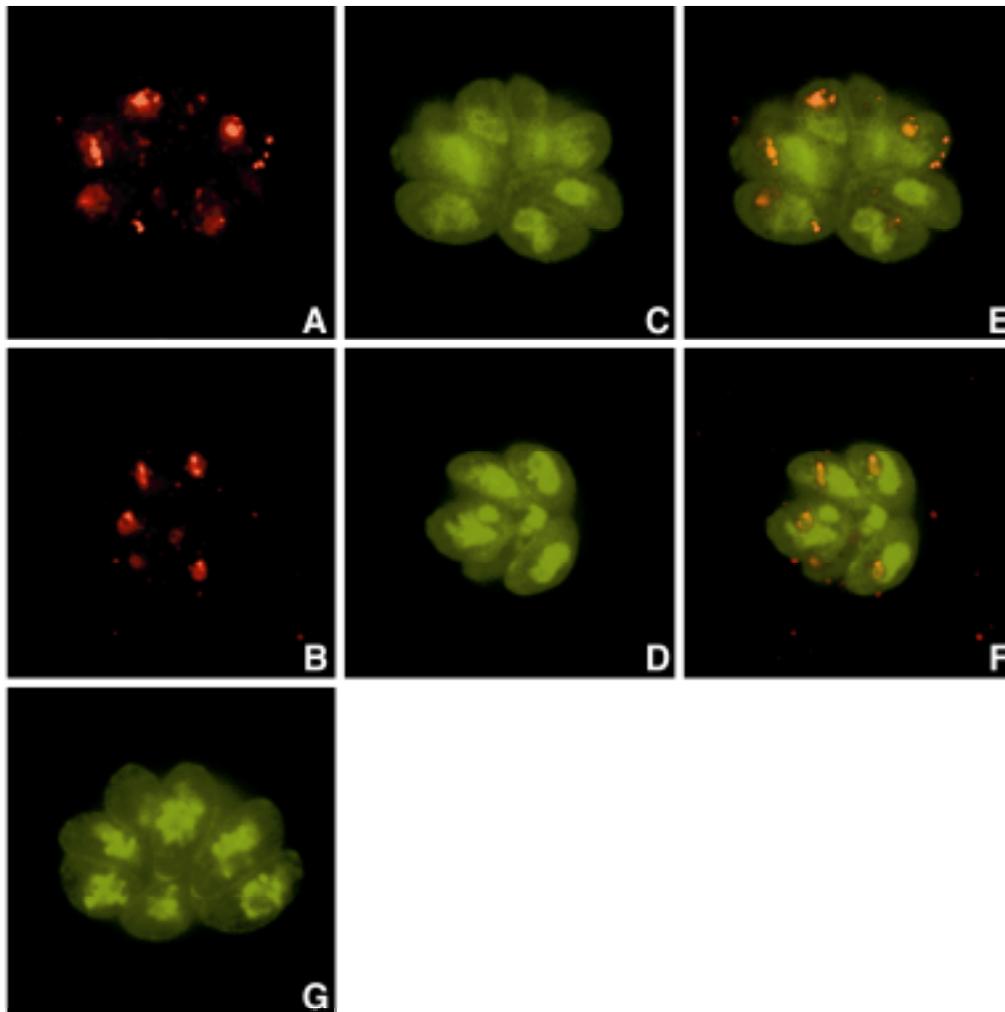


Abb. 4.17 Direkte Immunfluoreszenz-Analyse mit GFP bzw. indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit Serum #96, gereinigt, 1:500 verdünnt, sekundärer Ak Alexa 594-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak. HFF-Zellen waren mit rekombinanten Parasiten infiziert worden, die entweder stabil GFP-AKM (nicht gezeigt), GFP-9 AS+AKM (Bild D) oder GFP-(GP)SKL (Bild C) exprimierten. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Kontrolle mit zytosolischem GFP (G). Die Bilder A und B zeigen die Färbung der selben Vakuolen in C und D mit Serum #96, E zeigt die Überlagerung von A und C, F von B und D.

Alle drei GFP-PTS1 Fusionsproteine zeigten die gleiche Verteilung innerhalb der Zelle wie zytosolisches GFP und keine spezifische Übereinstimmung mit der von Serum #96 erkannten Struktur. Als Kontrolle dienten Parasiten, die stabil ein nicht mit einer Signalsequenz fusioniertes GFP exprimieren, welches die Tendenz hat, im Nukleus zu akkumulieren, Bild (G) (Hettmann et al., 2000). Offensichtlich werden die GFP-PTS1-Proteine in *T. gondii* nicht in Peroxisomen importiert. Zudem wurden in der EST-Datenbank von *T. gondii* keine Hinweise für PEX-Gene gefunden, deren Proteine, die Peroxine, für die Biogenese und Aufrechterhaltung des Organells unerlässlich sind.

4.1.11 Bedeutung der Katalase in *T. gondii*

Das Ausschalten eines Gens gibt Aufschluß über die Funktion des Gen-Produktes für die Zelle, deshalb sollte eine Katalase-Gen-defiziente Toxoplasmen-Zelllinie hergestellt werden. Zudem sollte sich dadurch klären lassen, welche der vier Anti-*T. gondii*-Katalase Seren spezifisch die Katalase erkennt, weil diese Struktur in der *knock out* Zelllinie verschwunden sein müßte.

Da lineare DNA in *T. gondii* bevorzugt unspezifisch ins Genom integriert, sind zum gezielten Ausschalten bzw. Ersetzen von Genen durch doppelt homologe Rekombination lange Bereiche flankierender Regionen chromosomaler DNA erforderlich (Donald und Roos, 1994). Da die in der Zellkultur verwendeten Toxoplasmen ein haploides Genom besitzen, muss nur ein Allel ersetzt werden.

4.1.11.1 Herstellung der zum Ausschalten des Katalase-Gens verwendeten Konstrukte

Um die *T. gondii* Katalase durch homologe Rekombination zu ersetzen, wurde eine Resistenzkassette, in diesem Falle *HXGPRT*, zwischen die 5'- und 3' flankierenden Regionen der *Toxoplasma gondii* Katalase gesetzt. Als Vektor diente *pminHXGPRT* (Vektor „2855“) (Donald et al., 1996), in dem das *HXGPRT*-Gen unter Kontrolle des *DHFRTS* (Dihydrofolat-Reduktase-Thymidilat-Synthase)-Promotors und 5'-UTR und der *DHFRTS* 3'-UTR (*Untranslated Region*, nicht translatierte Region) exprimiert wird. Die genauen Größen der 5'- und 3'-UTR des Katalase-Gens sind nicht bekannt, es wurde 5' vom ATG ein 1760 bp umfassendes 5'-Konstrukt und 3' ein 2750 bp großes 3'-Konstrukt erzeugt, wobei der *primer* *cz1242* so lokalisiert ist, dass das erzeugte 3'-Konstrukt noch die Exons 7, 8 und 9 sowie die Introns 7 und 8 umfasst (1466 bp). Zur Herstellung des 5'-*knock out* Konstruktes wurde eine PCR auf genomische Prugniaud DNA mit den *primern* *cz1268*, der eine *KpnI*-Schnittstelle besitzt, sowie *cz1269*, der eine *HindIII* Schnittstelle besitzt, gemacht. Dieses Konstrukt wurde in den mit *KpnI/HindIII* geschnittenen Vektor *pminHXGPRT* kloniert. Anschließend wurde der Vektor mit *BamHI* und *NotI* geschnitten, um das 3'-*knock out* Konstrukt hineinklonieren zu können, welches durch PCR auf genomische Pruginaud DNA mittels der *primer* *cz1242*, der eine *BamHI* Schnittstelle besitzt, und *cz1243*, der eine *NotI* Schnittstelle besitzt, erzeugt wurde. In beiden Fällen erfolgten Subklonierungen über den *TOPO TA Cloning®*-Vektor, aus dem die Fragmente durch die in den *primern* enthaltenen Schnittstellen herausgeschnitten werden konnten.

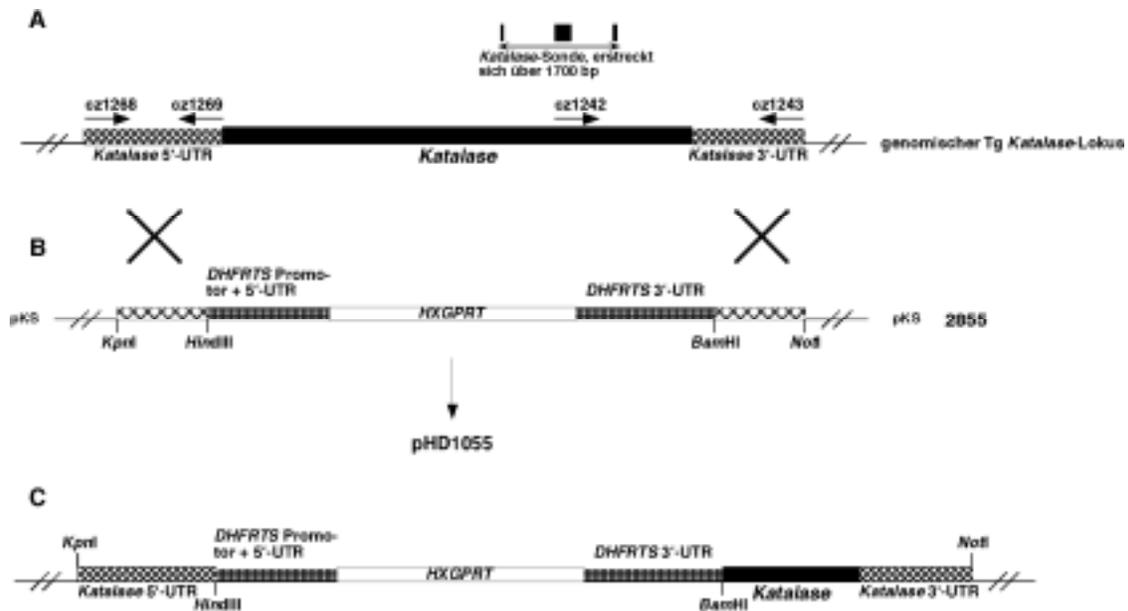


Abb. 4.18 Schematische Darstellung zur Erzeugung des *knock out*-Konstruktes. In **A** ist der genomische *Katalase*-Lokus zu sehen, die Sonde ist im Maßstab abgebildet. Gezeigt sind auch die *primer*, die zur Erzeugung von Teilen der *Katalase* 5'-UTR bzw. der 3'-UTR (+ Teile des Gens) verwendet wurden. **B** zeigt den Vektor 2855, in den die über PCR erzeugten *T. gondii* *Katalase* UTRs mittels der Enzyme *KpnI/HindIII* bzw. *BamHI/NotI* kloniert wurden. **C** Hier ist der resultierende Vektor **pHD1055** zu sehen, der aus der Resistenzkassette und den *T. gondii* *Katalase* UTRs (sowie Resten des ORF) besteht und für die Transfektion verwendet wurde, um *knock out* Klone zu erhalten.

Der Vektor pHD1055 wurde zur Transfektion des *Toxoplasma gondii* RH Stammes (RH*hxgprt*) sowie des *Toxoplasma gondii* Prugniaud Stammes (Pr*hxgprt*) verwendet. Der Vektor war vor der Transfektion mit *NotI* linearisiert worden. Verwendet wurden *Toxoplasmen* aus frisch lysierten Wirtszellen, je etwa 1×10^8 Zellen wurden transfiziert; die Selektion auf das Vorhandensein des *HXGPRT*-Markers erfolgte mit MPA und Xanthin, und stabile Transformanten wurden durch limitierende Verdünnung kloniert. Um den *Katalase knock out* in RH zu erzeugen, wurden 2 verschiedene Transfektionen mit 40 und 60 μg DNA durchgeführt. Aus der Transfektion mit 40 μg DNA wurde ein Klon verwendet, der sich als *Katalase*-Gen-negativ erwies: RHKat_{ko} (für *knock out*). Für die Erzeugung des Prugniaud *Katalase*-Gen *knock out* wurden vier verschiedene Konzentrationen pHD1055 verwendet, namentlich 30, 40, 50 und 60 μg DNA. Aus der Transfektion mit 50 μg Vektor wurde ein Klon verwendet, der sich als *Katalase*-Gen-negativ erwies: PrKat_{ko}. Einige Klone wurden auch herausselektioniert, die durch unspezifische Integration entstanden waren: Sie tragen zwar das Resistenzgen, sind aber *Katalase*-Gen-positiv und werden als Kontrollklone verwendet. RHKat_{kon} bzw. PrKat_{kon}.

4.1.11.2 Western Blot-Analyse der Katalase *knock out* Klone

Die erzeugten Klone wurden auf einem 12 %-igen SDS-Gel (A) bzw. auf 7,5 %-igen SDS-Gelen (B und C) überprüft. Als Ladekontrolle diente das Protein MIC4 aus *T. gondii*, welches durch das Anti-MIC4 Serum detektiert wurde, als Marker diente die Gibco 10 kDa *Protein ladder*.

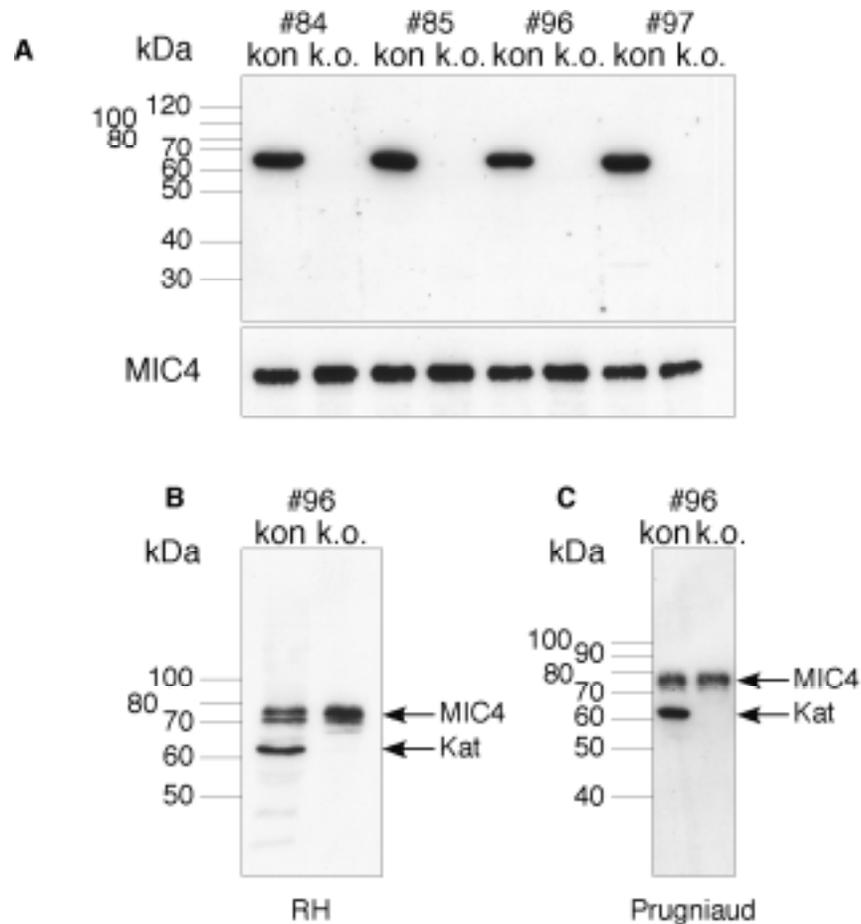


Abb 4.19 **A** Gezeigt ist ein *Blot*, auf dem sich alternierend das Ripa-Lysat der Kontrollzelllinie RHKatkon (kon) und der *Katalase knock out* Zelllinie RHKatko (k.o.) befindet (pro Spur ca. 3×10^6 Zellen). Je eine Doppelspur wurde mit den vier gereinigten Anti-*T. gondii*-Katalase Seren inkubiert, nach dem Strippen mit MIC4 Serum. **B** Klon RHKatko nach nochmaliger Subklonierung, um eine klonale Zelllinie zu erhalten, der *Blot* wurde, wie in C auch, mit dem Anti-MIC4 Serum und Serum #96 inkubiert. Pro Spur waren ca. $1,25 \times 10^6$ (*knock out* Lysat) bzw. $2,5 \times 10^6$ (RHKatkon) Zellen geladen worden. **C** Gezeigt sind das Ripa-Lysat einer Prugniaud Kontrollzelllinie PrKatkon (kon) sowie das Lysat der Prugniaud *Katalase knock out* Zelllinie; pro Spur waren ca. 3×10^6 Zellen geladen worden. Die Inkubation erfolgte mit den unter B genannten Seren, alle Seren wurden 1:1000 verdünnt.

Nachdem sowohl im RH Stamm (mit keinem der Seren war die Katalase in RHKatko detektierbar) als auch im Prugniaud Stamm das Ausschalten des Katalase-Gens erfolgreich

war, und sich die sonst unter der Hauptbande erscheinenden schwachen Banden als Degradation erwiesen hatten, wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt.

4.1.11.3 Immunfluoreszenzanalyse des *Katalase knock out* Klons

Um den *Katalase knock out* in der Immunfluoreszenzanalyse zu untersuchen wurden HFF-Zellen mit Tachyzoiten der RH *Katalase knock out* Zelllinie (RHKatko) infiziert und fixiert. Mit den zwei gereinigten Seren gegen die *T. gondii* Katalase, die nach der Reinigung noch Strukturen detektiert hatten, namentlich Serum #84 und Serum #96, wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt, Verdünnung 1:500. Es ergab sich das gleiche Bild wie in Abbildung 4.12: Sowohl der Apicoplast als auch die perlschnurartige Struktur, die mit Serum #96 detektiert worden war, wurden immer noch erkannt. Es konnte sich hierbei also nicht um das selbe Protein handeln, das im *Western Blot* mit Wildtyp-Lysat erkannt und in den *Katalase knock out* Zelllinien verschwunden war, sondern um Kreuzreaktionen des Serums in der Immunfluoreszenzanalyse. Dies schien zu bedeuten, dass durch die Aufreinigung der Seren das Protein zwar im *Western Blot* noch erkannt wurde, die in der IFA funktionierenden spezifischen Antikörper jedoch durch die Prozedur verloren gegangen waren. Nach dem Aufreinigen war mit den Seren #85 und #97, die nur zytosolische Färbungen gezeigt hatten, in der IFA kein Signal mehr zu sehen, und auch die Seren #84 und #96 verloren ihre zytosolische Färbung fast ganz, erkannten aber noch die apikalen Strukturen. Somit musste die *T. gondii* Katalase im Zytosol lokalisiert sein, denn alle Antikörper hatten vor der Reinigung die Gemeinsamkeit, eine zellzyklus-abhängige Färbung des Zytosols zu zeigen. Dies ist sowohl in Übereinstimmung mit den Fraktionierungsexperimenten (s. 4.1.5.1 und 4.1.5.2) als auch mit der Lokalisation der GFP-PTS1 Fusionskonstrukte (s. 4.1.10).

Deshalb wurde wieder auf die ungereinigten Seren zurückgegriffen, um das Verschwinden der Katalase auch in der Immunfluoreszenzanalyse deutlich zu machen. Tatsächlich war keine zytosolische Fluoreszenz mehr zu sehen, wenn die IFA mit dem RHKatko Klon durchgeführt wurde. Der Prugniald *Katalase knock out* Klon (PrKatko) wurde nicht in der IFA getestet, da bei diesem Stamm ca. 70 % der Parasiten in Zellkultur als Tachyzoiten, aber nur ca. 30 % aus Bradyzoiten bestehen, die mittels des Antikörpers gegen SAG4 kenntlich gemacht werden können. Es wäre nur ein unvollständiges Bild des *Katalase knock out* in Bradyzoiten möglich, da sie willkürlich verteilt sind. Da der RH Stamm nur aus Tachyzoiten besteht, wurde dieser Stamm für die Demonstration des *Katalase knock outs* in der Immunfluoreszenzanalyse verwendet.

In Anlehnung an Abbildung 4.8 wurde stellvertretend für alle vier Anti-*T. gondii*-Katalase Seren das Serum #84 verwendet, das, wie sich erst durch den *knock out* herausstellte, eine Kreuzreaktivität mit dem Apicoplasten zeigt, wodurch allerdings die *Katalase knock out* Zelllinie in der IFA noch deutlich zu erkennen ist.

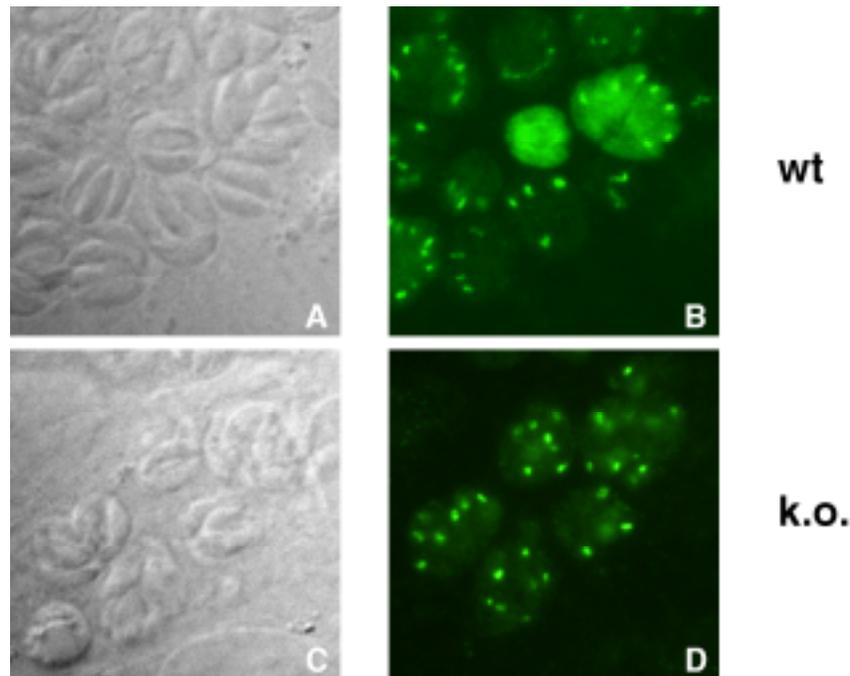


Abb. 4.20 **A** und **B** Es handelt sich hier um die selbe Abbildung wie Abb. 4.8, um die Unterschiede zwischen Wildtyp und *Katalase knock out* Zelllinie zu verdeutlichen: HFF-Zellen wurden mit Tachyzoiten des RH Stammes (*RHhxgprt*) infiziert. **D** HFF Zellen wurden mit dem RHKatko Klon infiziert und anschließend eine Immunfluoreszenzanalyse mit Serum #84, nicht gereinigt, 1:500 verdünnt, durchgeführt. **C** zeigt die **D** korrespondierende Dic Aufnahme. Zweit-Antikörper Alexa 488-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak

Die Parasiten sind in 4.20 **D** nur noch anhand ihrer mit dem Apikoplasten kolocalisierenden Struktur zu erkennen, ansonsten ist nur noch ein diffuses zytoplasmatisches Signal zu sehen.

Somit stellte sich heraus, dass es sich bei der *Toxoplasma gondii* Katalase um ein zytoplasmatisches, zellzyklus-abhängig exprimiertes Protein handelt, und dass es sich bei den apikalen Strukturen mit den Seren #84 und #96, namentlich dem Apicoplasten bzw. der perlschnurartigen Struktur, um eine Kreuzreaktion dieser Seren handelte, die in der *knock out* Zelllinie deshalb nicht verschwinden. Die Katalase konnte somit nicht als Markerenzym für Peroxisomen in *Toxoplasma* dienen, und es stellte sich die Frage nach ihrer Funktion, gerade im Hinblick auf diese unerwartete Lokalisation.

4.1.12 Etablierung diverser Zelllinien zur Untersuchung der Funktion der *T. gondii* Katalase

4.1.12.1 Herstellung des *Katalase* cDNA Konstruktes

Um die Funktion der *T. gondii* Katalase untersuchen zu können, sollten diverse Katalase-exprimierende Zelllinien hergestellt werden; zunächst wurde *T. gondii* Katalase cDNA, die mittels der *primer* cz1519 und cz1520 in einer RT-PCR mit RNA des RH Stammes als Matrize generiert worden war, in den *TOPO TA Cloning*[®]-Vektor kloniert. Mittels der in den *primern* enthaltenen Schnittstellen (*Mfe*I und *Pac*I) konnte es dort herausgeschnitten und in den Vektor pTUB8MycHisGFP-HXGPRT kloniert werden, der zuvor mit *Eco*RI und *Pac*I geschnitten worden war, um das *Myc-tag*, das *His-tag* sowie *GFP* zu entfernen. Der resultierende Vektor erhielt den Namen pHD1108, die Katalase cDNA steht unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden TUB8 Promotors, die 3'-UTR stammt wiederum von *SAG1*; als Resistenzgen diente *HXGPRT* (siehe auch die Beschreibung zu Abb. 4.16).

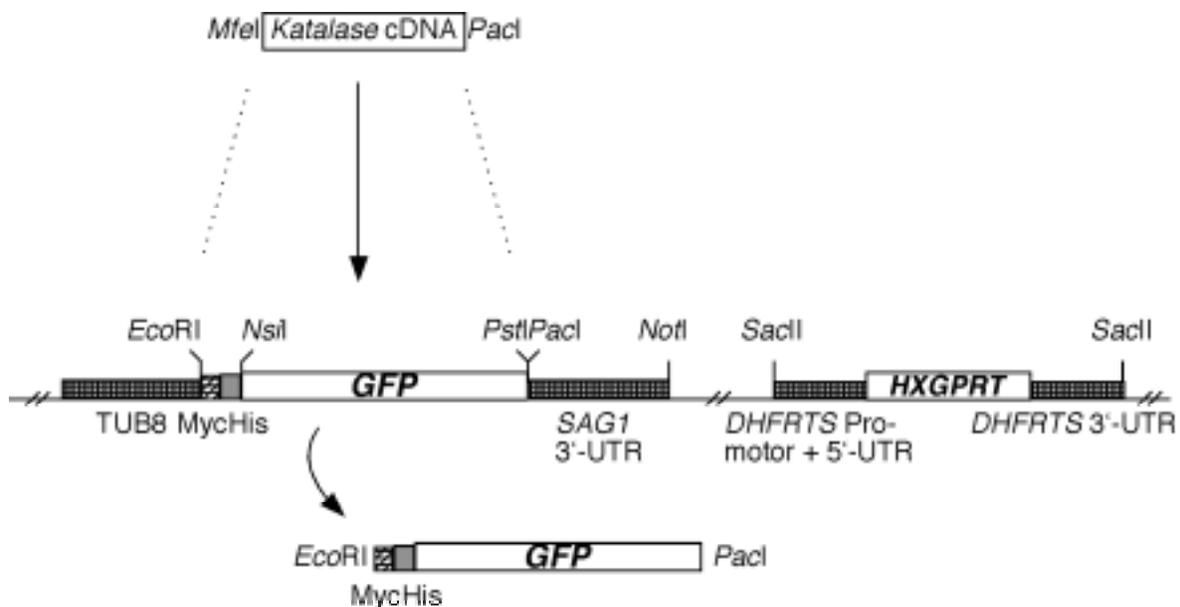


Abb. 4.21 Gezeigt ist der Vektor pTUB8MycHisGFP-HXGPRT, in den nach der Entfernung von Myc/His/GFP das *T. gondii* Katalase cDNA Fragment hineinkloniert worden war. Die 3'-UTR stammt von *SAG1* ab. Der so resultierende Vektor wurde als **pHD1108** bezeichnet.

Es sollten sowohl der RH Stamm (RH*hxgprt*) als auch der RHKatko Klon mit dem Konstrukt pHD1108 transfiziert werden. RH*hxgprt*, um zu sehen, was bei Überexpression der *T. gondii* Katalase geschieht, RHKatko, um den *Katalase knock out* zu komplementieren; der Grund hierfür war, dass bei der Erzeugung der Zelllinie RHKatko durch das unspezifische Integrieren in das Genom des Parasiten andere Gene betroffen sein könnten, die dann für einen Phänotyp verantwortlich sein könnten, der fälschlicherweise dem Ausschalten des Katalase-Gens zugeschrieben wird.

Die RH*hxgprt* Parasiten (ca. 5×10^7) wurden mit 80 µg pHD1108 transfiziert, welches zuvor mit *SacI* linearisiert worden war. Selektioniert wurde mit Mycophenolsäure und Xanthin. Die *Katalase knock out* Zelllinie RHKatko, in der schon die Integration des *knock out* Konstruktes pHD1055 mittels Mycophenolsäure und Xanthin bewirkt worden war, und bei der die HXGPRT-Gen Kasette ins Genom integriert hatte, wurde mit 100 µg des Vektors pHD1108, geschnitten mit *SacII*, transfiziert; das Schneiden mit diesem Restriktionsenzym bewirkte das Entfernen der HXGPRT-Kasette aus dem Vektor, da sie ohnehin nicht gebraucht wird. Zusätzlich wurden in den Transfektionsansatz 20 µg des Vektors pTUB8/CAT (linearisiert mit *BamHI*) gegeben, selektioniert wurde dann mit Chloramphenicol, da dieser Vektor für eine Chloramphenicolacetyltransferase kodiert. Auch wurde REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) durchgeführt (Black et al., 1995), der Transfektionsansatz enthielt 100 *UnitsBamHI*.

Aus beiden Transfektionen gingen positive Klone hervor: RHKatov (für *overexpressor*), die Katalase überexprimierende Zelllinie, sowie RHKatomp (für Komplementation), d.h. der mit Katalase komplementierten Klon RHKatko.

Diese Klone wurden nun zu einem Vergleich auf dem *Western Blot* herangezogen.

4.1.12.2 *Western Blot* mit diversen *T. gondii* Klonen, die Katalase (nicht) exprimieren

Um eine etwaige Abschätzung über die Expression der Katalase in den verschiedenen Klonen zu haben, wurde ein *Western Blot* durchgeführt, auf den folgende Stämme/Zelllinien aufgetragen wurden: RH*hxgprt* (als Wildtyp), RHKatko, RHKatov, RHKatomp, Pr*hxgprt* (als Wildtyp) und PrKatko.

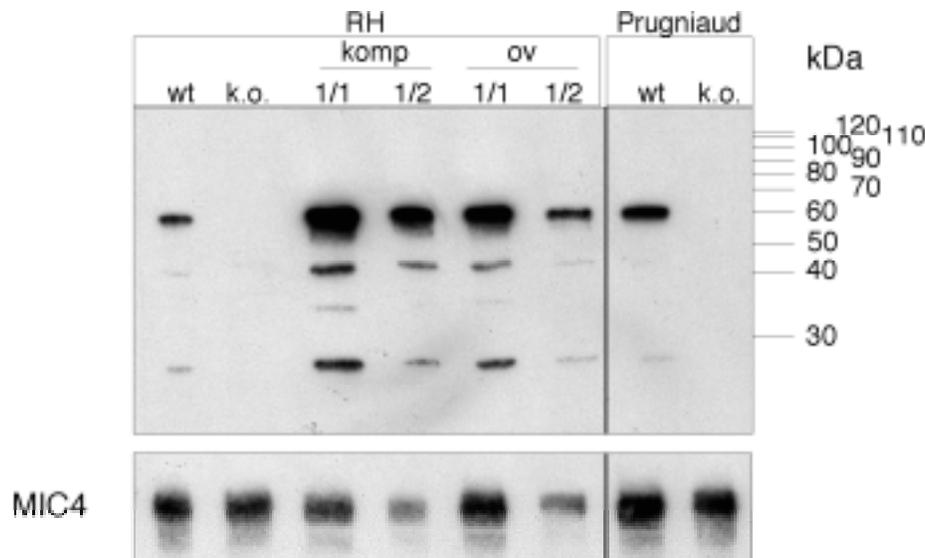


Abb. 4.22 *Western Blot* mit Extrakten von diversen Zelllinien. Je 2×10^6 Zellen wurden pro Spur auf ein 10 %-iges Gel geladen, bis auf die beiden Spuren, die mit 1/2 bezeichnet wurden, hier wurden 1×10^6 Zellen geladen, da sowohl in Klon RHKatov als auch in Klon RHKatomp die Katalase stark exprimiert zu sein scheint und die Vergleichbarkeit gewahrt werden sollte. RH*hxgprt*⁻ und Pr*hxgprt*⁻ wurden hier als wt bezeichnet, RHKatomp als komp und RHKatov als ov. Als k.o. wurden die Katalase-defizienten Klone RHKatko bzw. PrKatko bezeichnet. Inkubiert wurde der *Western Blot* mit dem gereinigten Serum #96, 1:1000. Nach dem Strippen wurde der *Blot* mit 1:1000 verdünntem Anti-MIC4 Serum inkubiert, als Ladekontrolle.

Durch den *Western Blot* mit den diversen *T. gondii* Zelllinien wurde deutlich, dass sowohl von der Zelllinie RHKatov als auch von der Zelllinie RHKatomp mehr Katalase exprimiert wird als vom Wildtyp. Zudem wird durch den Vergleich mit den *Katalase knock out* Zelllinien deutlich, dass es sich bei den unter der Hauptbande befindlichen Banden um Degradationsprodukte und nicht um Kreuzreaktionen handeln muss, da sie frei davon sind.

4.1.12.3 Charakterisierung der Klone RHKatov und RHKatomp in der Immunfluoreszenzanalyse

Der Klon RHKatov, der Katalase durch das Einbringen von *T. gondii* Katalase cDNA überexprimiert, sowie der Klon RHKatomp, bei dem das endogene Katalase-Gen ausgeschaltet worden war und mittels Katalase cDNA wieder eingeführt wurde, sollten in der Immunfluoreszenzanalyse auf die Lokalisation der Katalase überprüft werden. Hierzu wurden HFF-Zellen mit diesen beiden Klonen infiziert.

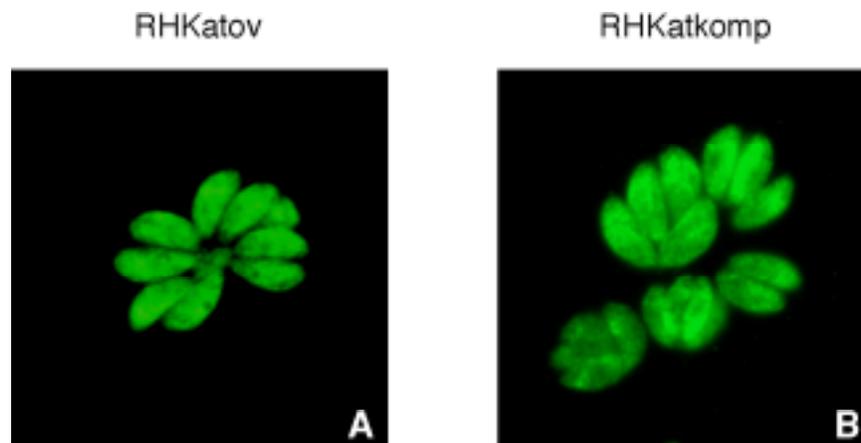


Abb. 4.23 Immunfluoreszenzanalyse mit den Klonen **A** RHKatov bzw. **B** RHKatomp mit dem Serum #96, 1:500 verdünnt. Zweit-Antikörper Alexa 488-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak.

Die Katalase ist im ganzen Zytosol verteilt und wird nicht zellzyklus-abhängig exprimiert, da die *Katalase* cDNA unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors TUB8 steht. Es wurde hier Serum #96, gereinigt, verwendet (ungereinigte Seren ergaben ein ähnliches Bild sowie eine Färbung der Parasitophoren Vakuole, nicht gezeigt). Durch die hohe Expression an Katalase reichten selbst die wenigen nach der Aufreinigung im Serum verbliebenen und in der IFA noch funktionierenden Antikörper aus, um die Katalase zu detektieren. In der Vakuole links in Bild B ist teilweise auch noch die perlchnurartige Kreuzreaktion zu sehen.

4.1.13 Enzym-assays mit Zellextrakten verschiedener *T. gondii* Klone

Um sowohl die Rolle als auch die Funktion der *T. gondii* Katalase festzustellen, wurden Enzym-assays durchgeführt. Es handelte sich einerseits um einen Katalase-assay, bei dem die in Abb. 4.22 gezeigten Zelllinien auf die Aktivität der Katalase hin untersucht werden sollten. Da das Substrat der Katalase, das Wasserstoffperoxid, sein Absorptionsmaximum bei 240 nm besitzt, konnte die Änderung der optischen Dichte bei 240 nm pro Zeiteinheit erfaßt werden, was ein Maß für die Katalase-Aktivität ist. Zudem diente der assay dazu, zu überprüfen ob es sich bei der ausgeschalteten *Katalase* um die einzige typische *Katalase* in *T. gondii* handelt. Der Versuch wurde in einer 1 ml Quarzküvette durchgeführt. Es wurden verschiedene Mengen der *T. gondii* Zellextrakte zugegeben, zwischen 2 und 12 μ l (das Endvolumen musste natürlich immer 1 ml betragen). Als Maß wurde die spezifische Aktivität angegeben, deren Einheit die *Units*/mg Protein ist; es muss betont werden, dass hier Zellextrakte verwendet wurden, so dass pro mg Gesamtprotein im Zellextrakt ausgegangen wurde, um eine Vergleichbarkeit der Werte zu erhalten, es handelt sich also nicht um die *Units*/mg Katalase.

Als Kontrolle wurde Rinderleber Katalase von Böhlinger verwendet, deren Aktivität mit 65000 U/mg angegeben wurde, Konzentration 20 mg/ml, sie wurde 1:2000 verdünnt im *assay* eingesetzt.

Die gleichen Zellextrakte wurden außerdem in einem Enzym-*assay* zur Messung der Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivität untersucht. Der Grund war folgender: Das Ausschalten des Katalase-Gens zeigte, zumindest unter Zellkulturbedingungen, keine negativen Auswirkungen. Da die meisten Zellen auch andere antioxidative Enzyme/Enzymsysteme besitzen, lag es nahe, dass die Funktion der Katalase von einem anderen Enzym übernommen worden war. Das Augenmerk richtete sich hierbei auf die Glutathion-Peroxidase, die, ebenso wie Katalasen, Wasserstoffperoxid zerlegen kann. Während Katalasen ausschließlich in der Lage sind, Wasserstoffperoxid zu detoxifizieren, so können Glutathion-Peroxidasen auch diverse andere Peroxide unschädlich machen. Sie benötigen hierzu allerdings, wie der Name schon sagt, Glutathion. In *Toxoplasma gondii* war bis dato keine Glutathion-Peroxidase beschrieben worden. Mittlerweile jedoch existieren in der Datenbank (GenBank) und der *Toxoplasma gondii* Clustered EST Database mehrere ESTs (aus sporulierten Oozysten bzw. Bradyzoiten, deren Identität als Glutathion-Peroxidase angegeben wurde (BM176640, BM039715, AA520892, AA531754)). Es handelt sich hier um einen gekoppelten Enzym-*assay*, der auf der Änderung der Absorption bei 340 nm durch die Umsetzung von NADPH + H⁺ zu NADP⁺ beruht. Die Abnahme bei A₃₄₀ pro Zeiteinheit, die den Verbrauch von NADPH anzeigt, ist somit ein Maß für die GPx-Aktivität. Der ganze Ansatz wurde in einer 90 µl Küvette durchgeführt, wobei 5 bzw. 10 µl aus dem zu testenden Zellextrakt bestanden.

Während Katalase-Aktivitäten messbar waren und Unterschiede zwischen den getesteten Klonen deutlich wurden, konnte im GPx-*assay* keine GPx Aktivität gemessen werden, die sich von der Hintergrundaktivität (ohne Zellextrakt) unterschied; der GPx-*assay* wurde mit Cumolhydroperoxid als Substrat durchgeführt. Da hierfür die gleichen Zellextrakte wie für die Katalase-*assays* verwendet wurden, sollten die Extrakte also prinzipiell in Ordnung gewesen sein. Die Katalase-*assay* Werte setzen sich aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen zusammen.

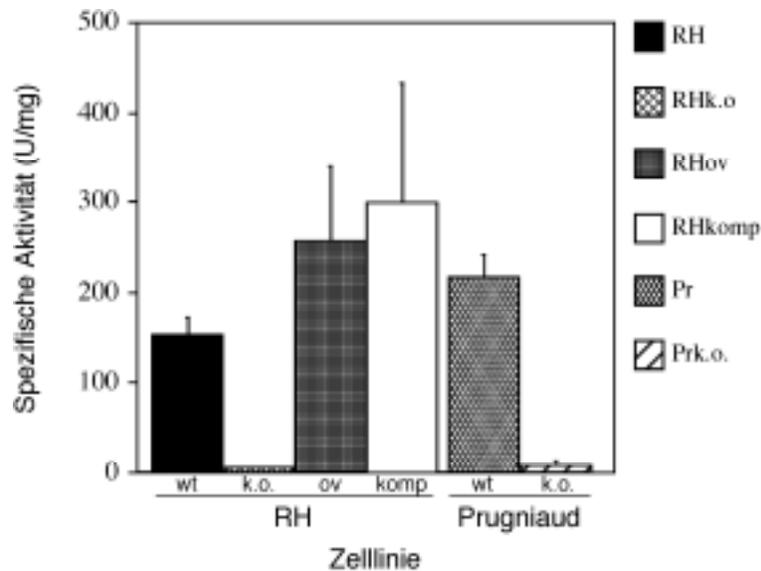


Abb. 4.24 Auswertung des Katalase Enzym-assays mit den Zelllinien *RHhxgprt*⁻ (RHwt), *RHKatko* (RHk.o.), *RHKatov* (RHov), *RHKatomp* (RHkomp), *Prugniaudhxgprt*⁻ (Prwt) sowie *PrKatko* (Prk.o.). Jeder gezeigte Balken zeigt den Durchschnitt aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die beiden *Katalase knock out* Zelllinien zeigen so gut wie keine Katalase-Aktivität mehr, die verbleibende Aktivität kann von anderen Bestandteilen des Extraktes herrühren oder von Resten der Wirtszellenzyme. RHkomp hat eine leicht höhere Aktivität als RHov, und beide zeigen eine höhere Aktivität als die beiden wt Zelllinien, von denen wiederum Prwt höhere Aktivität als RHwt zeigt.

Die Enzym-assays erbrachten den Beweis, dass die *T. gondii* Katalase tatsächlich funktionell ist. Auch scheint keine andere typische *Katalase* vorhanden zu sein, denn in den Zellextrakten der Katalase-defizienten Zelllinien ist nur eine Hintergrundaktivität vorhanden: *RHKatko* $3,8 \pm 0,4$, *PrKatko* $6,4 \pm 4,9$. Interessanterweise war im Pruginaud Stamm eine höhere Aktivität messbar als im RH Stamm: Pruginaud: $215,2 \pm 25,5$, RH $152 \pm 18,9$, eventuell lässt dies auf eine Rolle der Katalase als Dormanzfaktor schließen. Allerdings wurde bisher noch kein Bradyzoiten *Katalase* EST gefunden.

RHKatomp ($299,5 \pm 131$ U/mg) und *RHKatov* ($256,7 \pm 81,6$ U/mg) liegen, was ihre Aktivität betrifft, in den Erwartungen etwas zurück, denkt man an die hohe Expression im *Western Blot* (Vergleiche Abb.4.22), was eventuell an einer nicht korrekten Faltung oder der Limitierung des Häms (Skoneczny und Rytko, 2000) liegen könnte. Es gab durchaus Schwankungen, was an den Standardabweichungen ablesbar ist. Die als Kontrolle eingesetzte Böhlinger Katalase erzielte bei meinen Messungen einen Durchschnittswert von 49600 U/mg (Standardabweichung 3504), angegeben worden war sie mit 65000 U/mg, was im Rahmen

liegt. Erwähnt werden muss nochmals, dass diese Katalase eine Konzentration von 20 mg/ml hatte, es sich bei den Toxoplasmen Messungen jedoch um Zellextrakte handelte.

Dass im GPx-*assay* keine Aktivität zu messen war, kann an mehreren Faktoren liegen: Die GPx wird eventuell stadienspezifisch exprimiert und ist in den verwendeten Stämmen nicht oder nicht ausreichend vorhanden; oder aber die Verwendung von kruden Zellextrakten reicht zur Detektierbarkeit des Proteins nicht aus. Es ist durchaus auch möglich, dass die GPx, anstelle von Glutathion ein anderes Substrat, z.B. Thioredoxin, benötigt, oder Cumolhydroperoxid nicht detoxifizieren kann.

4.1.14 Behandlung verschiedener *Toxoplasma gondii* Zelllinien mit Wasserstoffperoxid

Die Katalase-defizienten Toxoplasmen unterschieden sich in der Zellkultur augenscheinlich nicht von den Wildtyp-Toxoplasmen. Dies liegt wahrscheinlich an der Tatsache, dass die verwendeten Wirtszellen, Vero und HFF-Zellen, nicht in der Lage sind, (genügend) oxidativen Stress auf die Parasiten auszuüben. Deshalb wurde ein Wasserstoffperoxid-*assay* etabliert, bei dem frisch lysierende extrazelluläre Parasiten verwendet wurden. Da die Katalase in der Lage ist, Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff zu zerlegen, sollten Katalase-defiziente Toxoplasmen empfindlicher gegen die Chemikalie sein. Sollten sie es nicht sein, so könnte dies ebenso ein Hinweis dafür sein, dass, zumindest bis zu einem gewissen Grade, andere oxidative Enzyme in der Lage sind die Funktion der Katalase zu übernehmen. Allerdings besteht immer noch die Möglichkeit, dass diese Enzyme nicht rechtzeitig ausreichend exprimiert werden.

Es wurden verschiedene Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verwendet; als Medium diente das auch ansonsten verwendete Zellkulturmedium, welches, wie üblich, mit Glutamin versetzt wurde. Das FCS wurde nicht zugegeben, da es den Versuch dahingehend verfälschen könnte, dass die enthaltenen Proteine durch ihre Thiolgruppen als Puffer wirken würden. Die extrazellulären Parasiten wurden mit 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M und 10^{-5} M Wasserstoffperoxidlösung (d.h. 30 %ige Wasserstoffperoxidlösung wurde in DMEM FCS auf die obengenannten Konzentrationen verdünnt) inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit DMEM FCS allein. Um sicher zu gehen, dass es sich nicht um eine Zweitinfektion handelt, wurden in die Zählung nach 48 h nur Vakuolen ≥ 4 Parasiten aufgenommen. Jeder Wert setzt sich aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen zusammen. Die Werte der unbehandelten Zellen wurden als 100 % gesetzt, weil bei unabhängigen Experimenten und durch die Verwendung verschiedener Zelllinien die

Viabilität der Parasiten schlecht einzuschätzen ist und stark schwanken kann. Deshalb wurden die Resultate mit den unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen innerhalb der einzelnen Zelllinien in Prozent ausgedrückt, anstatt die Gesamtzahl der Vakuolen anzugeben. Verglichen wurde der Wildtyp (RH*hxprt*) mit RH Katalase-defizienten Parasiten (Klon RHKatko) sowie den Klonen RHKatov und RHKatomp.

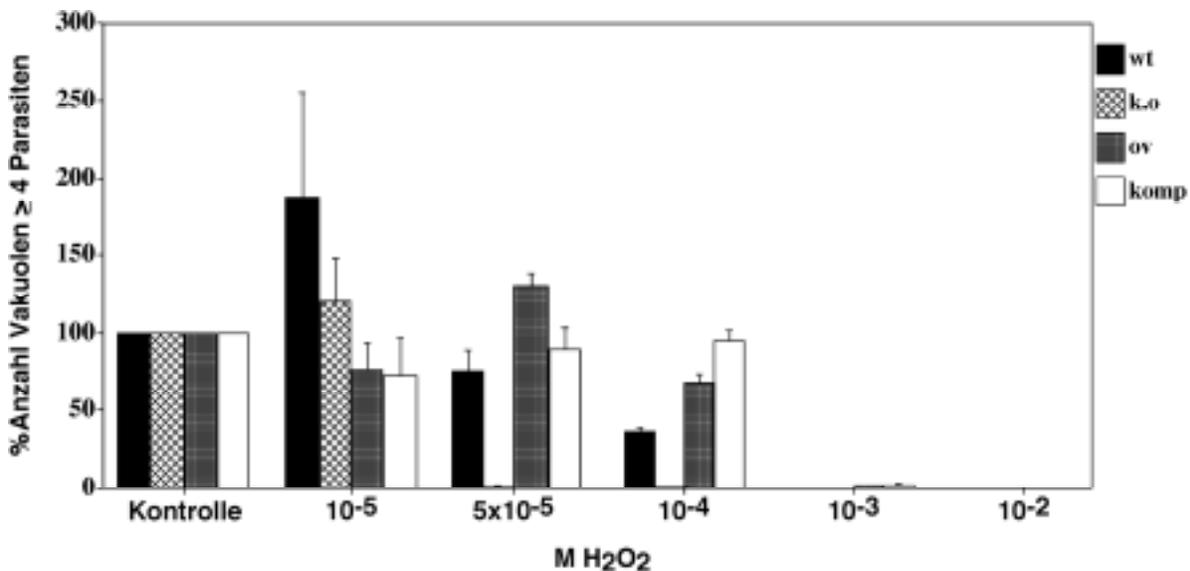


Abb. 4.25 Graphische Darstellung des Wasserstoffperoxid-assays. Drei verschiedene Klone wurden verwendet, um sie mit RH*hxprt* (wt) Parasiten zu vergleichen: Der Katalase-defiziente RH Klon RHKatko (k.o.), der Katalase überexprimierende Klon RHKatov (ov) sowie der komplementierte Katalase knock out RHKatomp (komp). Die unbehandelten Zellen wurden als 100 % gewertet.

Der Wasserstoffperoxid-assay zeigte eine Tendenz: Der Katalase-defiziente RH Klon war empfindlicher als der Wildtyp: Bei einer Konzentration von 5×10^{-5} M waren fast alle Zellen tot ($1 \pm 1,1$ %) (d.h. Vakuolen ≥ 4 Parasiten in % von unbehandelten Zellen), wohingegen der Wildtyp noch einen Wert von $75,5 \pm 13,7$ % aufwies. Auffällig auch, dass sich sowohl RHKatov als auch RHKatomp bis zu einer Molarität von 10^{-4} M Wasserstoffperoxid nicht stark von der unbehandelten Kontrolle unterschieden, wenn auch bei RHKatov größere Schwankungen zu beobachten waren. Darüberhinaus erhält man durch die Behandlung mit einer Konzentration von 10^{-3} M H_2O_2 nur in den Katalase-überexprimierenden Zellen noch wenige Überlebende: RHKatov $1,8 \pm 0,6$, RHKatomp 2 ± 1 %). Mit einer Molarität von 10^{-2} M Wasserstoffperoxid wurden die Zellen gänzlich getötet. Auch die größere Anzahl an Vakuolen bei Verwendung von 10^{-5} M Wasserstoffperoxid im Vergleich zu unbehandelten Zellen (beobachtet bei Wildtyp und RHKatko) ist erklärbar: Inzwischen wird davon ausgegangen, dass ROS (Reactive Oxygen Species) in geringen Konzentrationen die

Zellteilung stimulieren und als sekundäre Botenstoffe fungieren (Finkel, 1998; Sauer et al., 2001). Dies würde gerade im Hinblick auf die zellzyklusspezifische Expression der Katalase Sinn machen. Deshalb erklärt es auch, warum selbst der RHKatko hier Werte über 100 % liefert ($120,5 \pm 27,6$ %), denn ohne die Funktion der Katalase entstehen wiederum Radikale. Da der Wildtyp jedoch höhere Werte erzielt ($187,2 \pm 68,7$ %), scheint die Katalase eine notwendige Regulierungsfunktion zu erfüllen. Die beiden Klone RHKatkomp und RHKatov haben durch die Überexpression der Katalase eventuell schon im nicht-behandelten Zustand ein Maximum an Viabilität erreicht, welches selbst durch Stimulation mit Wasserstoffperoxid nicht mehr überschritten werden kann. Bei einer Behandlung mit 10^{-5} M H_2O_2 erzielten sie Werte von $75,9 \pm 18,3$ % (RHKatov) bzw. $72,3 \pm 24,8$ % (RHKatomp). Eine Behandlung mit 10^{-4} M H_2O_2 resultierte in $36,4 \pm 3,4$ % (Wildtyp), $0,8 \pm 0,7$ % (RHKatko), $68,3 \pm 6,5$ % (RHKatov) sowie $95,5 \pm 7$ % (RHKatomp). Die Katalase scheint also wichtige Funktionen unter oxidativen Stress-Bedingungen zu erfüllen.

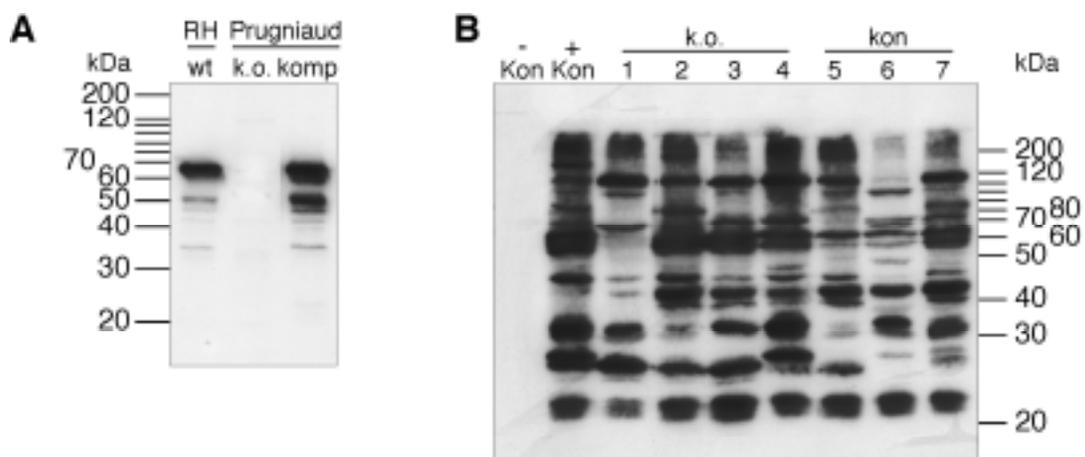
4.1.15 Untersuchung der Katalase-defizienten Toxoplasmen im Mäusemodell

T. gondii besitzt eine weitgehend klonale Populationsstruktur, sie umfasst drei verschiedene klonale Linien. Außerdem werden die Stämme in zwei größere Gruppen unterteilt, basierend auf ihrer Fähigkeit Mäuse zu töten, nachdem diese intraperitoneal mit Tachyzoiten infiziert wurden. Die Typ I-Linie enthält ausschließlich Toxoplasmen-Stämme, die für Mäuse hochvirulent sind (Sibley und Boothroyd, 1992). Die Infektion mit einem Parasiten dieser hochvirulenten Stämme ist für Mäuse letal. Da der RH Stamm zu der Typ I-Linie gehört ist er für Mäuse letal, sie sterben im allgemeinen innerhalb von 8-12 Tagen unabhängig vom verwendeten Mausstamm (Howe et al., 1996). Durch die akute Infektion wird eine inflammatorische Immunantwort ausgelöst, die zum Tod führt. Es findet keine chronische Infektion und Enzystierung der Parasiten im Gewebe der Maus statt. Nichtvirulente Stämme haben für Mäuse LD_{50} Werte von 10^2 bis $> 10^5$ Parasiten, und chronische Infektionen können leicht etabliert werden. Die Mäuse sterben gewöhnlich 10-20 Tage nach der Infektion. Nichtvirulente *T. gondii* Stämme findet man nur in den Typ II- und Typ III-Linien (Howe und Sibley, 1995; Sibley und Boothroyd, 1992). Deshalb wurde für diesen Versuch der nichtvirulente *T. gondii* Prugniaud Stamm verwendet, der in der Lage ist, Zysten zu bilden.

Die verwendeten C57BL/6 Mäuse zeichnen sich durch ihre Empfänglichkeit gegenüber einer durch die Toxoplasmen verursachten Enzephalitis aus. Nach der Infektion werden die Mäuse krank und verlieren das Gleichgewicht, sie entwickeln eine nicht gut kontrollierbare

Enzephalitis und sterben. Es sollten in diesem Versuch die Auswirkungen auf die Pathologie der infizierten Mäuse durch das Ausschalten der *T. gondii* *Katalase* untersucht werden. Infiziert wurde mit Katalase-defizienten Toxoplasmen des Prugniaud Stammes, als Kontrolle dienten Toxoplasmen, die zwar das Resistenzgen *HXGPRT* integriert hatten, die aber noch Katalase-Gen positiv waren (PrKatkon). Die Parasiten wurden intraperitoneal (i.p.) injiziert und die überlebenden Mäuse nach ca. 4-5 Wochen auf Anti-*T. gondii* Serologie getestet, um sicherzugehen, dass die Mäuse infiziert gewesen waren, was der Fall war. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig durchgeführt, mit drei unterschiedlichen Mengen an für die Infektion verwendeten Toxoplasmen. Für die letzte Versuchsdurchführung wurde ein zusätzlicher Klon hergestellt, es handelte sich um den mit Vektor pHD1108 transfizierten Klon PrKatko, d.h., die Prugniaud *Katalase* knock out Zelllinie wurde mit *Katalase* cDNA komplementiert. Die Transfektion erfolgte mit 100 µg Vektor pHD1108 (linearisiert mit *SacII*) sowie 20 µg Vektor pTUB8/CAT (linearisiert mit *BamH1*). Außerdem wurde REMI durchgeführt. Die Selektion erfolgte mittels Chloramphenicol. Einer der erhaltenen Klone, Klon PrKatkomp, wurde in die dritte Versuchsdurchführung mit einbezogen um zu untersuchen ob durch das Wiedereinbringen der *Katalase* in die Katalase-defiziente Zelllinie die ursprüngliche Pathologie wiederhergestellt wird. Da für den letzten Versuch 3 Zelllinien verwendet wurden, wurde mit nur zwei verschiedene Mengen Toxoplasmen infiziert (in Klammern Versuchsdurchführung 2 bzw. 3 und veränderte Parasitenmengen).

4 Mäuse (5 Mäuse) (6 Mäuse)	2500 Parasiten (250)
5 Mäuse (5 Mäuse) (6 Mäuse)	10 000 Parasiten (1000)
4 Mäuse (5 Mäuse)	100 000 Parasiten



Vorige Seite: Abb.4.26 A *Western Blot* (mit Ripa-Lysaten) mit dem neu hergestellten Klon PrKatKomp; Je Spur wurde die 3×10^6 Zellen entsprechende Menge auf ein 10 %-iges SDS-Gel geladen. Positive Kontrolle: RH*hxgprt* (wt) Parasiten negative Kontrolle Klon PrKatko (k.o.); Klon PrKatKomp (komp) (Inkubation mit #84, ungereinigt, 1: 750) **B** zeigt einen typischen *Western Blot*, auf dem die Seren der überlebenden Mäuse getestet wurden (Ergebnis mit den Seren der überlebenden Mäuse nach Versuchsdurchführung 2). Auf jede Spur eines 12 %-igen SDS-Gels wurde Zellextrakt entsprechend 2×10^6 Zellen (*Prhxgprt*) geladen. Auf der ersten Spur (Kon-) ist die Inkubation mit dem Serum einer nicht infizierten Maus (negative Kontrolle, 1:250 verdünnt), auf der zweiten Spur (Kon+) die Inkubation mit Serum eines chronisch infizierten Tieres (positive Kontrolle, 1:500 verdünnt) zu sehen. Bei den mit 1 - 4 nummerierten Spuren handelt es sich um die Seren von mit PrKatko infizierten, überlebenden Mäusen, bei den Spuren 5 - 7 um Seren von Mäusen, die mit Prugnau infiziert worden waren, die zwar *HXGPRT*-positiv sind, aber auch noch Katalase exprimieren (Verdünnung der Seren 1:500).

Die Katalase wird in PrKatKomp stark exprimiert. Die Kontrollseren in B wurden freundlicherweise vom Labor Dr. D. Schlüter zur Verfügung gestellt. Beim Marker handelte es sich um die 10 kDa *Protein ladder* von Gibco. Alle Mäuse waren infiziert gewesen.

Versuchsdurchführung 1

Tage nach der Infektion	Zahl der für die jeweilige Infektion verwendeten Mäuse	Zahl der Parasiten/Maus	Anzahl der toten Mäuse (in Abhängigkeit von den Tagen nach der Infektion)					
			8	9	10	11	12	13
Klon: kon	4	1×10^5	2	2				
	5	1×10^4		2		2		
	4	2500			1	1	1	1
Klon: k.o.	4	1×10^5		2				1
	5	1×10^4						
	4	2500				1		

Versuchsdurchführung 2

Tage nach der Infektion	Zahl der für die jeweilige Infektion verwendeten Mäuse	Zahl der Parasiten/Maus	Anzahl der toten Mäuse (in Abhängigkeit von den Tagen nach der Infektion)									
			7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Klon: kon	5	1×10^5	1	3	1							
	5	1×10^4			3			1				
	5	2500				1	2					
Klon: k.o.	5	1×10^5				1	1	1				
	5	1×10^4					2				1	1
	5	2500									1	1

Ferner verstarb noch eine Maus von k.o. an Tag 17 nach der Infektion

Versuchsdurchführung 3

Tage nach der Infektion	Zahl der für die jeweilige Infektion verwendeten Mäuse	Zahl der Parasiten/Maus	Anzahl der toten Mäuse (in Abhängigkeit von den Tagen nach der Infektion)					
			11	12	13	14	15	16
Klon: kon	6	1000		1				
	6	250		2				
Klon:	6	1×10^4						
k.o.	6	2500						
Klon: komp	6	1000	1				1	
	6	250		2	1	1		

Abb. 4.27 Tabellarische Übersicht über den Verlauf der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit Parasiten des Prugnau-Stammes; Kon: PrKatkon, k.o.: PrKatko; komp: PrKatkomp.

Die überlebenden Mäuse aus den drei Versuchsansätzen zeigten allesamt einen positiven serologischen Befund und waren alle infiziert gewesen (Daten nicht gezeigt). Die Angabe 250

bzw. 1000 Parasiten (kon, komp) bei Versuchsdurchführung 3 bezieht sich darauf, dass die Mäuse nur mit der Zehntelmenge an Parasiten infiziert wurden wie die Mäuse mit PrKatko. Die Mäuse, die mit PrKatkon bzw. PrKatkomp Parasiten infiziert wurden starben früher bzw. starben überhaupt.

Die Versuchsdurchführung 1 zeigte einerseits, dass die mit PrKatkon Parasiten infizierten Mäuse zu einem früheren Zeitpunkt starben als die mit Katalase-defizienten Parasiten (PrKatko) infizierten Mäuse, andererseits, dass auch eine größere Anzahl an Mäusen verstarb. Bei Versuchsdurchführung 2 ist zu erkennen, dass fast ebenso viele Mäuse, die mit Katalase-defizienten Toxoplasmen infiziert wurden, starben, wie von der Kontrolle PrKatkon; dennoch scheinen die mit Katalase-defizienten Toxoplasmen infizierten Mäuse zeitlich etwas verzögert zu sterben.

Bei Versuchsdurchführung 3 wird ersichtlich, dass insgesamt wenige Mäuse verstorben sind, und dass von den Mäusen, die mit der Katalase-defizienten Zelllinie infiziert wurden, keine verstarb, obwohl die zum Infizieren verwendete Parasitenzahl 10x höher war als bei den Vergleichsmäusen; der Grund dass mit einer PrKatkon sowie PrKatkomp Infektion nur so wenige Mäuse starben im Vergleich zu Versuchsdurchführung 1 und 2 liegt daran, dass nur mit einem Zehntel der Parasiten infiziert worden war. Die Durchführung mit der komplementierten Zelllinie, deren Ergebnis dem der PrKatkon Zelllinie ähnelt, deutet darauf hin, dass der vorher beobachtete Unterschied zwischen PrKatkon und PrKatko tatsächlich auf dem Ausschalten des Katalase-Gens beruhten.

Das Ausschalten des Katalase Gens-scheint Auswirkungen auf die Pathogenität zu haben, es scheinen weniger Mäuse zu sterben und wenn, dann zeitverzögert im Vergleich zur Kontrolle.

4.2 Identifizierung zweier putativer *Peroxidoxine* in *T. gondii*

Peroxidoxine sind eine wachsende Familie von Antioxidantien, die in fast allen Organismen zu finden sind; sie unterscheiden sich von den typischen antioxidativen Enzymen Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase durch die Abwesenheit von eng gebundenen Metallionen und prosthetischen Gruppen (Rahlfs und Becker, 2001), die sie nicht für ihre Funktion benötigen. Sie sind in der Lage, Wasserstoffperoxid, Alkylhydroperoxide und andere Peroxide zu zerlegen und verhindern somit, wie z. B. Katalasen und Glutathion-Peroxidasen auch, die Bildung von Hydroxylradikalen. Sie besitzen ein redox-aktives Cystein, Cys47. Unterteilt werden die Peroxidoxine in 1-Cys- und 2-Cys-Peroxidoxine, abhängig von einem zweiten konservierten Cystein, dem Cystein 170. Die Nummerierung basiert auf der Hefe Thioredoxin-Peroxidase (TPx), ebenfalls ein Peroxidoxin. Die beiden Gruppen unterscheiden sich auch in der Sequenzumgebung des konservierten Cys47: 1-Cys Peroxidoxine haben die Sequenz PVCT, 2-Cys Peroxidoxine die Sequenz FVCP. Da 1-Cys Peroxidoxine auch in Gruppen der Archaeobakterien gefunden wurden, geht man von einem uralten Ursprung aus (McGonigle et al., 1998). 2-Cys Peroxidoxine wurden bisher nicht in diesen Organismen gefunden. Häufig werden Thiole zur Funktion benötigt. Peroxidoxine gehören zu den häufigsten Proteinen einer Zelle und sind an unterschiedlichsten Stellen innerhalb der Zelle lokalisiert.

In einigen parasitären Organismen ist zwar die Superoxid-Dismutase vorhanden, jedoch sind Glutathion-Peroxidase und/oder Katalase nicht zu finden. Deshalb eignen sich die Peroxidoxine auch als Kandidaten, die diese Funktionen, gerade auch die Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid, übernehmen könnten.

Dass das Ausschalten des Katalase-Gens in *T. gondii* sich für das Überleben des Parasiten in der Zellkultur nicht merklich auswirkte, kann einerseits daran liegen, dass die verwendeten Wirtszellen, namentlich HFF- und Vero-Zellen, keinen oder nur wenig oxidativen Stress verursachen, andererseits, dass ein/mehrere andere/s Enzym/e diese Funktion übernimmt/-nehmen. Eventuell treffen auch beide Varianten zu.

Zwei *Peroxidoxine*, ein *1-Cys Peroxidoxin* und ein *2-Cys Peroxidoxin* aus *T. gondii* wurden kloniert.

4.2.1.2 Ermittlung der Sequenz eines *T. gondii* 1-Cys Peroxidoxins

In der *T. gondii* EST-Datenbank wurde eine Reihe überlappender ESTs gefunden, deren Sequenz Ähnlichkeit mit 1-Cys Peroxidoxinen zeigten (W06115, W63470, AA519386, AA520160, AA520491). Diese ESTs wurden zu einer Sequenz zusammengefügt, und die primer cz1517 und Oligo 671 verwendet, um das Gen mittels RT-PCR auf *T. gondii* RH RNA herauszuamplifizieren. Es erfolgte dann die Klonierung in den TOPO TA Cloning®-Vektor und eine anschließende Sequenzierung. Auch wurde, um das 5'-Ende zu erhalten, eine 5'-RACE mit dem 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0, von Gibco, durchgeführt. Es resultierten 5 Banden mit unterschiedlichen Größen, die aus einem Agarosegel eluiert und in den TOPO TA Cloning®-Vektor kloniert wurden. Bei der Sequenzierung zeigte jedoch keine der Banden Ähnlichkeit mit Peroxidoxinen, so dass das 5'-Ende noch nicht bestätigt ist. Anhand des Protein-alignments mit verschiedenen anderen 1-Cys Peroxidoxinen lässt sich vermuten, dass es sich um das richtige Methionin handelt, dennoch ist nicht auszuschließen, dass das Protein N-terminal etwas länger ist. Auch wurde eine PCR auf genomische Prugniaud DNA gemacht, mit den primern cz1517 und cz1544. Dieses Fragment wurde in den TOPO TA Cloning®-Vektor kloniert und sequenziert. Das Gen besteht aus 4 Exons und 3 Introns.

A



B

Exon (E)/Intron (I) Nr.	Erstreckt sich von bp bis bp	Länge bp
E1	1-111	111
I1	112-648	537
E2	649-777	129
I2	778-1246	469
E3	1247-1504	258
I3	1505-1797	293
E4	1798-1974	177

Abb.4.29 **A** Schematische Darstellung der Exon/Intron Regionen des 1-Cys Peroxidoxins aus *T. gondii*, im Maßstab; „E“ steht hier für Exon, symbolisiert durch schwarze Rechtecke, welche durch die Intron-Regionen, die durch schwarze Längs-Striche dargestellt werden, getrennt sind. **B** zeigt die tabellarische Übersicht über die Größe der Exons/Introns bzw. wo sie sich erstrecken.

4.2.2 Klonierung zweier *T. gondii* Peroxidoxine in einen *T. gondii* Expressionsvektor

Die beiden Proteine Pxn1 und Pxn2 sollten in der Zelle lokalisiert werden. Deshalb wurden Zelllinien hergestellt, die rekombinantes Pxn1 bzw. Pxn2 exprimieren. Hierzu wurde *Pxn1*, wie schon unter 4.2.1.1 beschrieben, mit den *primern* cz1539 und cz1540 auf genomische RH DNA via PCR amplifiziert. Das Fragment war mit *EcoRI* und *PstI* verdaut worden und wurde in den mit den Enzymen *EcoRI* und *NsiI* verdauten und gereinigten Vektor pTUB8MycGFPPf.myotailTy-1HX kloniert, aus dem nun das *myc-tag*, das *GFP* und *PfM-A tail* herausgeschnitten war (dieser Vektor ist eine Abänderung des in Abb. 4.16 beschriebenen Vektors pTUB8MycGFPPfMtail). Anschließend erfolgte die unter 4.2.1.1 schon erwähnte Sequenzierung von *Pxn1*.

Nachdem die Sequenz für das *Pxn2* ermittelt worden war, wurde es mittels RT-PCR mit RNA des RH Stammes und den *primern* cz1603 und cz1604 amplifiziert, das Fragment mit *MfeI* und *NsiI* geschnitten und in den schon erwähnten, mit *EcoRI/PstI* geschnittenen Vektor pTUB8MycGFPPf.myotailTy-1HX kloniert.

Pxn1 und *Pxn2* stehen in dem Vektor unter der Kontrolle des Promotors TUB8 und besitzen C-terminal ein Ty-1-tag. Wenn im folgenden in dieser Arbeit vom Ty-tag die Rede ist, ist immer das Ty-1-tag (Bastin et al., 1996) gemeint, was der Vereinfachung der Bezeichnung der Klone dient.

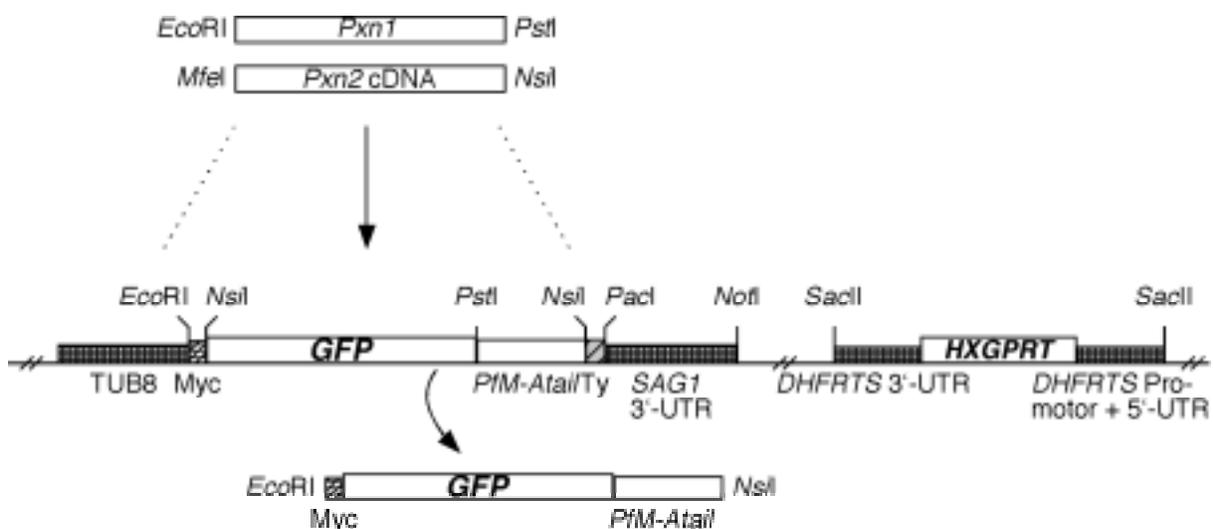


Abb. 4.31 Die beiden Fragmente *Pxn1* und *Pxn2* wurden in den mit *EcoRI* und *NsiI* geschnittenen Vektor pTUB8MycGFPPf.myotailTy-1HX kloniert und besitzen somit ein C-terminales Ty-tag. Das Konstrukt steht unter der Kontrolle des Promotors TUB8; außerdem besitzt der Vektor das HXGPRT-Gen. Die resultierenden Vektoren wurden als **pHD1234** (obengenannter Vektor + *Pxn1*-Insert) bzw. **pHD1264** (obengenannter Vektor + *Pxn2*-Insert) bezeichnet (siehe auch Abb. 4.16).

4.2.2.1 Herstellung von Zelllinien, die rekombinantes Pxn1 bzw. Pxn2 exprimieren

Toxoplasmen des RH Stammes, *RHhxgprt*, ca. 5×10^7 Zellen, wurden mit dem Vektor pHD1234 (Pxn1) bzw. pHD1264 (Pxn2) transfiziert.

Mit dem Vektor pHD 1234 wurden auch Parasiten der Zelllinie RHKatko (ca. 5×10^7 Zellen), die keine Katalase mehr exprimiert, transfiziert. Die *RHhxgprt* Parasiten wurden mit 100 μg *SacI* linearisiertem Vektor pHD1234 transfiziert und mittels Mycophenolsäure und Xanthin selektioniert. Die *Katalase knock out* Zelllinie RHKatko, in der schon die Integration des *knock out* Konstruktes pHD1055 mittels Mycophenolsäure und Xanthin bewirkt worden war, und die schon HXGPRT-Gen-positiv ist, wurde mit 100 μg des Vektors pHD1234, geschnitten mit *SacII*, transfiziert. Zusätzlich wurden in den Transfektionsansatz 20 μg des Vektors pTUB8/CAT (linearisiert mit *BamHI*) gegeben, selektioniert wurde dann mit Chloramphenicol, da dieser Vektor für eine Chloramphenicolacetyltransferase kodiert. Auch wurde REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) durchgeführt, der Transfektionsansatz enthielt 100 *UnitsBamHI*.

Für die Transfektion von *RHhxgprt* Parasiten mit dem Vektor pHD1264 wurden 100 μg *SacI* linearisierter Vektor pHD1264 verwendet.

Durch Selektion und anschließende limitierende Verdünnung wurden mit allen drei Transfektionen positive Klone erhalten, wie durch Immunfluoreszenzanalyse mit dem Anti-Ty-tag Antikörper bestätigt werden konnte (s. Abb. 4.34 A und B). Als schwieriger erwies es sich allerdings, die aus der Transfektion mit dem Vektor pHD1234 erhaltenen Klone im *Western Blot* auf das Vorhandensein der rekombinanten Proteine zu untersuchen. Erst unter Verwendung von Ripa-Lysat wurden gute *Western Blot* Ergebnisse erzielt.

4.2.2.2 Western Blot-Analyse der rekombinanten Peroxidoxine

Die unter 4.2.2.1 genannten Zelllinien wurden geerntet und mit Ripa-Lysat versetzt, um sie im *Western Blot* auf das Vorhandensein der rekombinanten Peroxidoxine zu untersuchen, hierfür wurden die Proteine mittels des Ty-tags am C-Terminus, d.h. mit dem Anti-Ty-tag Antikörper, detektiert. Es wurden jeweils 3×10^6 Zellen/Spur auf ein 15 %-iges SDS-Gel geladen. Als positive Kontrolle standen RH-Toxoplasmen von M. Reiß, AG Soldati, zur Verfügung, die das rekombinante Protein MIC6Ty exprimieren (Reiss et al., 2001). Hiervon wurden 1×10^7 Zellen/Spur aufgetragen. Als negative Kontrolle dienten *RHhxgprt* Parasiten. Interne Bezeichnung für die Zelllinien: RHPxn1Ty: *RHhxgprt* Parasiten, die mit pHD1234 transfiziert worden waren (und Pxn1Ty exprimieren), RHPxn2Ty: *RHhxgprt* Parasiten, die

mit pHD1264 transfiziert worden waren bzw. RHKatkoPxn1Ty: RHKatko Klon, der mit pHD1234 transfiziert worden war.

Die beiden erstgenannten Zelllinien sowie *RHhxgprt* Parasiten (negative Kontrolle) wurden auch noch der *freeze and thaw* Methode unterzogen, um die Parasiten mechanisch aufzubrechen (die Pellets waren in PBS + Proteaseinhibitoren aufgenommen worden). Durch die anschließende Ultrazentrifugation erhielt man eine lösliche (S) und eine verbleibende Membranfraktion (P). Die Analyse erfolgt in einem *Western Blot*. Unter der theoretischen Annahme, dass sich in beiden Fraktionen Proteine identischer Parasitenzahlen befinden, wurden ca. 3×10^6 Zellen/Spur auf ein 15 %-iges SDS-Gel geladen. Die Detektion erfolgte mittels des Anti-Ty-tag Antikörpers (1:1000).

Die nicht-getaggtten (endogenen) Proteine Pxn1 und Pxn2 haben ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 19,972 kDa bzw. 24,461 kDa sowie einen IEP von 7,4 und 6,4, respektive.

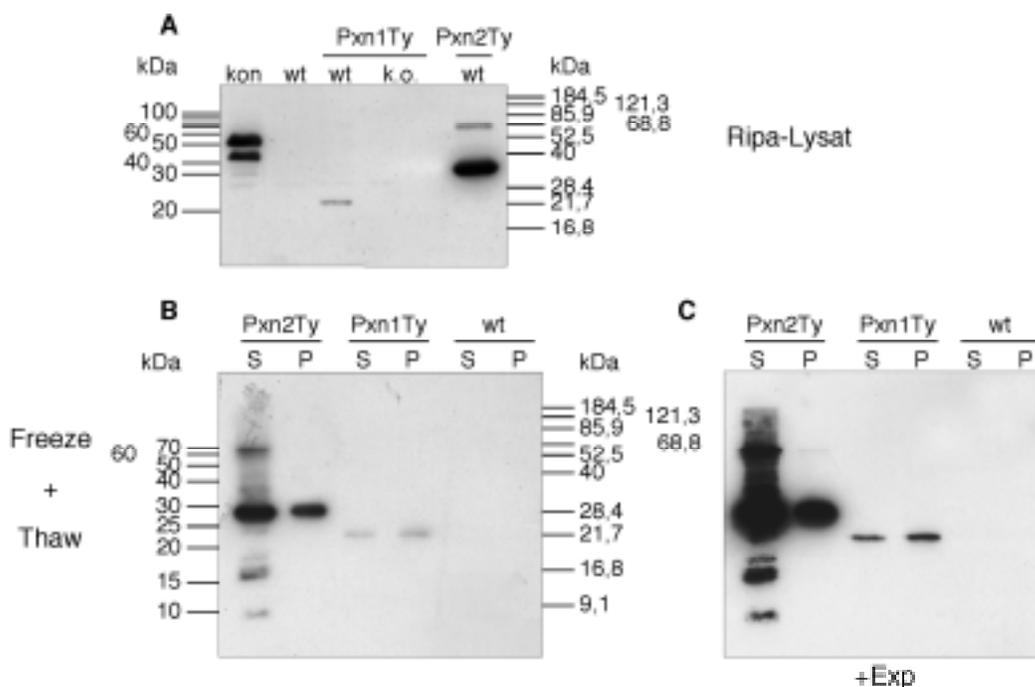


Abb. 4.32 **A** Analyse der Ripa-Lysate diverser Zelllinien: kon: RHMIC6Ty; wt: *RHhxgprt* Parasiten; Pxn1Ty wt: Klon RHPxn1Ty; Pxn1Ty k.o.: Klon RHKatkoPxn1Ty; Pxn2Ty wt: Klon RHPxn2Ty. **B** *Western Blot* mit den *freeze and thaw* Proben: S Überstand, P Pellet. Pxn1Ty: RHPxn1Ty, Pxn2Ty: RHPxn2Ty Extrakt. **C** wie **B**, mit höherer Expositionszeit, um das Vorhanden sein von Pxn1Ty zu verdeutlichen. Marker: 10 kDa *Protein ladder* (A, links) bzw. die *Benchmark Protein ladder* (B, links) und die *BENCHMARK™ Prestained Protein ladder* (A und B rechts).

Das Kontrollprotein MIC6Ty wurde erwartungsgemäß detektiert. Die Größen der detektierten Proteine Pxn1Ty bzw. Pxn2Ty (inklusive *tag*) entsprechen den vorhergesagten Größen für die endogenen Proteine.

Mit dem Klon RHPxn1Ty ist nur ein schwaches Signal im *Western Blot* (A) zu sehen; zwei Banden sind deutlich mit Klon RHPxn2Ty zu sehen. Im Lysat des Klons RHKatkoPxn1Ty wird das rekombinante Protein nicht (mehr) detektiert. In der für die Entdeckung positiver Klone durchgeführten Immunfluoreszenzanalyse mit dem Anti-Ty-tag Antikörper waren sowohl mit Klon RHPxn1Ty (siehe auch Abb.4.34 A) als auch mit Klon RHKatkoPxn1Ty (nicht gezeigt) starke Signale detektiert worden. Ein sauberer *Western Blot* gelang erst einige Zeit später, das Pxn1Ty des Klons RHKatkoPxn1Ty war dann weder in der Immunfluoreszenzanalyse noch im *Western Blot* detektierbar. Die für die Selektion nötig gewesene Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) war jedoch noch durch ein polyklonales Anti-CAT Serum nachweisbar, der Klon schien nicht vertauscht zu sein. Eventuell wurde die Expression des Pxn1Ty Proteins herunterreguliert. Das Pxn1Ty des Klons RHPxn1Ty war nach einiger Zeit in der Immunfluoreszenzanalyse nur noch schwach detektierbar, im *Western Blot* wurde ebenfalls ein schwaches Signal erhalten im Vergleich zum Pxn2Ty des Klons RHPxn2Ty. Eventuell war die Expression ebenfalls herunterreguliert worden.

Sowohl das Pxn1Ty aus Klon RHPxn1Ty als auch das Pxn2Ty aus Klon RHPxn2Ty sind nach Aufbruch und anschließender Ultrazentrifugation in der Pellet wie auch in der Überstand-Fraktion (B) und (C). Die zweite Bande bei ca. 68 kDa bei Pxn2Ty, die auch im Ripa-Lysat detektiert wurde (A) ist nur in der Überstandfraktion zu finden. Sie repräsentiert wahrscheinlich ein Dimer, wie es auch mit dem Reis 1-Cys Peroxidoxin der Fall ist (Lee et al., 2000), obwohl es sich hier um reduzierende SDS-Gele handelt.

4.2.2.3 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das *T. gondii* Pxn2 und Western Blot-Analyse der Seren

Gegen das *T. gondii* Pxn2 wurden Antikörper in Kaninchen hergestellt. Die gesamte Immunisierung inklusive der Peptidherstellung wurde von der Firma EUROGENTEC durchgeführt. Die Lage des Peptides ist im *alignment*, Abb.4.30, zu sehen. Die Kopplung erfolgte wieder an KLH. Zwei Kaninchen wurden immunisiert (interne Bezeichnung #1128 bzw. #1129, die auch für die Antiseren verwendet wird), und es stehen derzeit die Seren, die nach dem zweiten *boost* genommen wurden, zur Verfügung. Diese wurden in unterschiedlichen Verdünnungen im *Western Blot* auf ihre Spezifität getestet. Je Spur wurden 3×10^6 Zellen (RH $hxprt^-$) geladen; nach dem *Blotten* wurden die einzelnen Spuren mit verschiedenen Verdünnungen des Präimmunserums und des Serums inkubiert.

Des Weiteren wurde der *Blot*, auf den die *freeze and thaw* Proben nach der Ultrazentrifugation aufgetragen worden waren (s. Abb.4.32 B) gestrippt und mit dem Serum #1129 inkubiert, das im *Western Blot* eine Bande der richtigen Größe detektiert hatte.

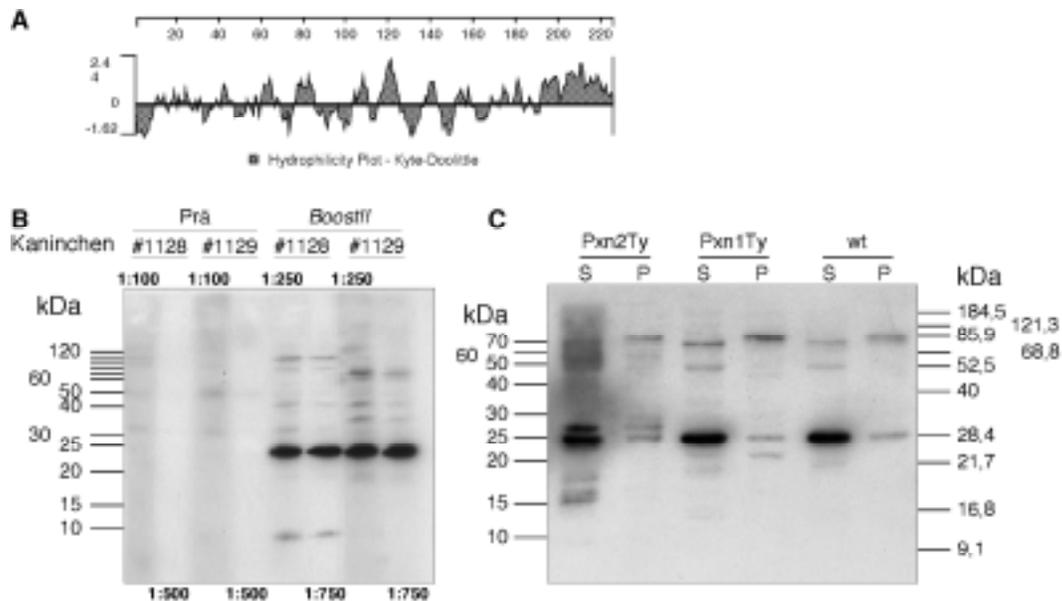


Abb. 4.33 A Hydrophilicity Plot nach Kyte-Doolittle, um immungene Regionen von Pxn2 zu finden. B Western Blot mit den Seren der Kaninchen #1128 und #1129 gegen das *T. gondii* Pxn2. Getestet wurden sowohl die Präimmunsere, 1:100 bzw. 1:500 verdünnt, sowie die Seren, die nach dem zweiten *boost* genommen worden waren, 1:250 bzw. 1:750 verdünnt. C Gestrippter Western Blot aus der Abb. 4.32 B, der mit dem Serum #1129, 1:750 verdünnt, inkubiert wurde. Marker: *Benchmark Protein ladder* (B und C) bzw. *BENCHMARK™ Prestained Protein ladder* (C).

Die Präimmunsere detektieren nichts spezifisch, wohingegen die Seren #1128 und #1129 spezifisch eine Bande auf der Höhe von ca. 25 kDa erkennen, was der erwarteten Größe von 24,461 kDa sehr nahe kommt (B).

In C handelt es sich bei der mit Pxn2Ty bezeichneten Spur um den Klon, der das rekombinante Pxn2Ty (RHPxn2Ty) exprimiert, deshalb wird hier vom Serum auch noch eine zweite, etwas größere Bande detektiert. Dass das Signal relativ schwach im Vergleich zu Abb. 4.32 B ausfällt, liegt wahrscheinlich daran, dass der Anti-Ty-*tag* Antikörper monoklonal ist und effizienter sein Epitop erkennt. Die „Dimer-Bande“ ist hier nicht zu sehen. Da keine weiteren Banden in der mit Pxn1Ty bezeichneten Spur zu erkennen sind, scheint das Serum nicht das *T. gondii* Pxn1 zu erkennen.

4.2.2.4 (Doppel-) Immunfluoreszenzanalysen auf die PxnTy exprimierenden Zelllinien und den Wildtyp mit verschiedenen Seren und Antikörpern

Die PxnTy exprimierenden Zelllinien, RHPxn1Ty bzw. RHPxn2Ty wurden in der (Doppel-) Immunfluoreszenzanalyse mit dem Anti-Ty-Antikörper auf das Vorhandensein und die Lokalisation von Pxn1Ty und Pxn2Ty getestet. Außerdem wurde eine IFA mit RH Parasiten (RH*hxgprt*) durchgeführt, um die gegen das *T. gondii* Pxn2 gerichteten Seren #1128 und #1129 auf ihre Funktionalität hin zu testen und das endogene Pxn2 zu lokalisieren.

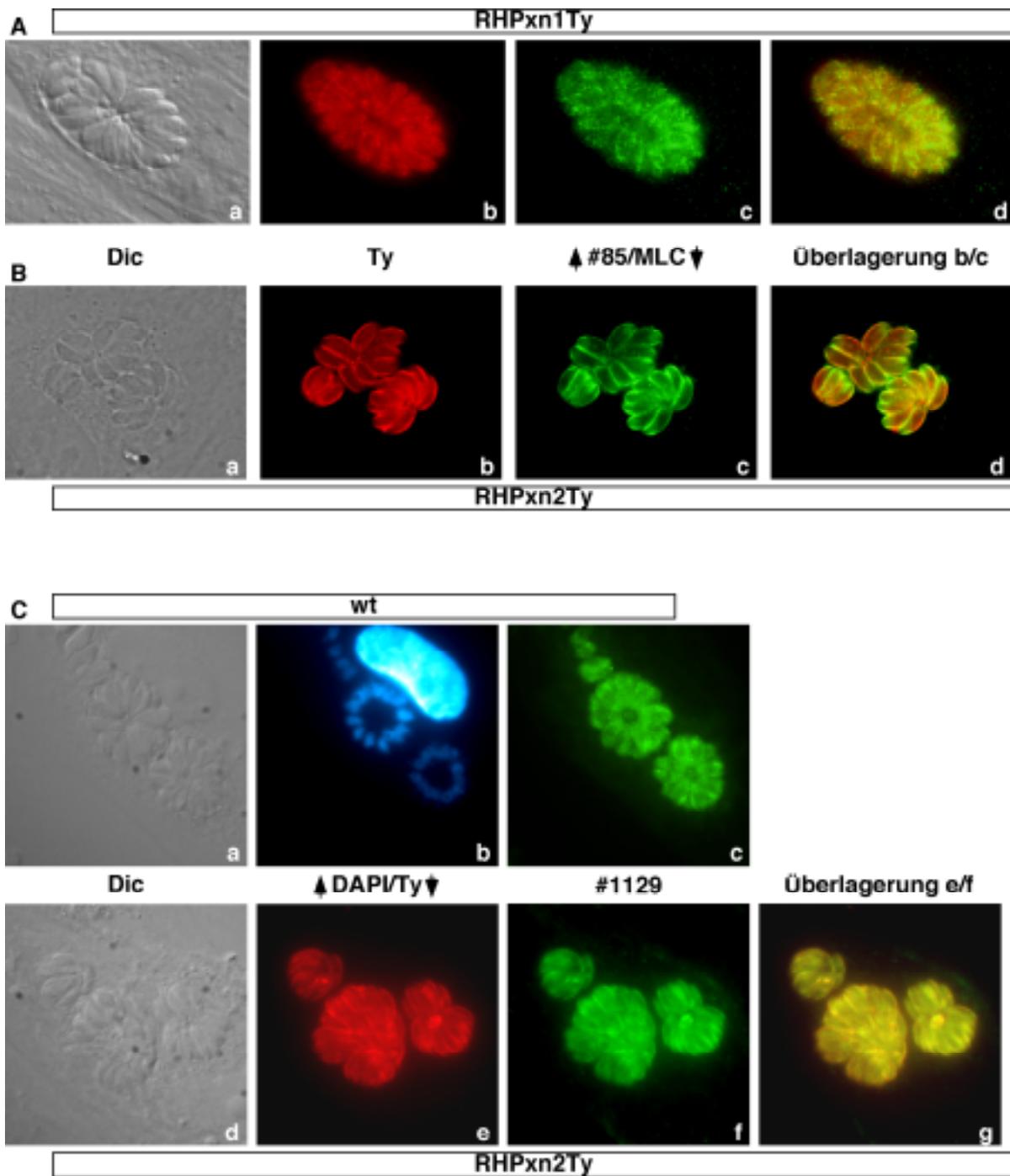


Abb. 4.34 HFF-Zellen wurden mit den Zelllinien RHPxn1Ty, RHPxn2Ty bzw. RHhxpri infiziert und mit 4% Paraformaldehyd/0,05% Glutaraldehyd fixiert. Verdünnungen der Seren: #85 (nicht gereinigt), MLC und #1129 1:500, Anti-Ty-tag Antikörper 1:2500. **A** zeigt die Zelllinie RHPxn1Ty, die sowohl mit dem Anti-Ty-tag Antikörper (**b**) als auch mit Serum #85 (*T. gondii* Katalase, zytosolisch) (**c**) inkubiert worden war. **B** Die Zelllinie RHPxn2Ty, die sowohl mit dem Anti-Ty-tag Antikörper (**b**) als auch mit dem Anti-*T. gondii*-MLC (*Myosin Light Chain*, lokalisiert an der Plasmamembran von *T. gondii*) Serum (**c**) inkubiert worden war. **C a-c** zeigt RHhxpri Parasiten, die mit dem Anti-*T. gondii*-Pxn2 Serum #1129 inkubiert worden waren (**c**). **b** zeigt die Kernfärbung mit DAPI, zu sehen ist außerdem der Kern einer Wirtszelle. **d-g** zeigt die Zelllinie RHPxn2Ty, die sowohl mit Anti-Ty-tag Antikörper (**e**) als auch mit Serum #1129 (**f**) inkubiert wurde; (**g**) zeigt die Überlagerung. (Serum #1128 ergab ein identisches Bild). Sek. Antikörper: Alexa 594-konjugierter Ziege- α -Maus-Ak (rot) bzw. Alexa 488-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Ak (grün).

Das rekombinante *T. gondii* Pxn1Ty zeigt eine zytosolische Lokalisation (allerdings zeigten die Parasiten nach einiger Zeit in der Zellkultur ein reduziertes Signal in der IFA, es handelt sich hier um eine der ersten Aufnahmen), was, im Laufe dieser Doktorarbeit, auch von einer anderen Gruppe mit Antikörpern gegen das endogene Protein gezeigt wurde (Son et al., 2001). Es handelte sich um die selbe Gruppe, die die Sequenz (ohne die N-terminalen 18 Aminosäuren) in die Datenbank gestellt hatte. Diese 18 Aminosäuren scheinen also keine Signalsequenzen zu enthalten.

Die Lokalisation des rekombinanten *T. gondii* Pxn2Ty im Klon RHPxn2Ty mit dem Anti-Ty-tag Antikörper scheint sowohl zytosolisch als auch an der Plasma- oder Alveolarmembran zu sein.

Allerdings zeigt sich unter Verwendung des Serums #1129 eine zytosolische Färbung, wenn auch einige heller leuchtende Stellen an der Plasma- oder Alveolarmembran zu erahnen sind. Verwendet man sowohl den Anti-Ty-tag Antikörper als auch Serum #1129 in einer Doppelimmunfluoreszenz mit der Zelllinie RHPxn2Ty, so ist wiederum sowohl eine zytosolische als auch eine leichte Plasma- oder Alveolarmembranlokalisation zu sehen.

Wie auch schon aus der *Western Blot*-Analyse (s. Abb. 4.32/4.33) zu entnehmen ist, scheint der (monoklonale) Anti-Ty-tag Antikörper das rekombinante Protein ungleich besser zu detektieren als das polyklonale Serum # 1129, was in der Bandenintensität deutlich wird. Das Vorhandensein von großen Mengen an Pxn2Ty in der Pelletfraktion nach *freeze + thaw* und anschließender Ultrazentrifugation könnte einerseits an einer Überexpression des Proteins und Aggregatbildung liegen, (Abb. 4.32 B) andererseits an einer Assoziation mit der Membran. Allerdings wird weitaus weniger Protein in der Pellet-Fraktion detektiert, wenn man das Serum #1129 verwendet (Abb. 4.33 B)

Dass das Serum #1129 mit Wildtyp-Zellen in der Immunfluoreszenzanalyse eine zytosolische Verteilung des Proteins, mit der Zelllinie RHPxn2Ty jedoch eventuell auch eine Plasma- oder Alveolarmembranlokalisation vermuten lässt, mag daran liegen, dass durch das zusätzlich vorhandene, rekombinante Pxn2Ty das Membran-Signal derart verstärkt wird, dass es deutlich sichtbar ist. Eventuell begünstigt das Ty-tag auch eine Konformation des Proteins, welche es besser detektierbar (an der Membran) für das Serum #1129 macht. Die Detektion des Proteins an unterschiedlichen Stellen der Zelle könnte auch mit dem Oligomerisierungszustand des Proteins zusammenhängen. Zu betonen bleibt jedoch, dass es sich bei den Seren #1128 und #1129 noch nicht um die endgültigen Seren handelt. Die Spezifität kann sich also noch ändern und lässt auf ein klareres Bild über die Lokalisation dieses Proteins und die damit verbundene Funktion hoffen.

5. Diskussion

Toxoplasma gondii ist ein eukaryontischer, intrazellulärer Parasit. Es ist deshalb bei wissenschaftlichen Fragestellungen von Interesse, die Unterschiede zwischen Wirt und Pathogen zu ermitteln. Bis zum Beginn dieser Doktorarbeit gab es noch keine Hinweise für *microbodies*, in nahezu allen Eukaryonten vorkommende Organellen (Waterham und Cregg, 1997), im Stamm Apicomplexa. In anderen niederen Eukaryonten, wie den Trypanosomen, die ebenfalls einzellige Parasiten sind, ist eine besondere Art von *microbodies* vorhanden, die sogenannten Glykosomen. *Microbodies* waren also schon früh in der Eukaryontenevolution ein wichtiger Bestandteil der Zelle, und ihre Funktion hängt wohl auch mit dem Auftreten molekularen Sauerstoffs in der Frühzeit der Evolution zusammen. Dennoch ist bis heute die Notwendigkeit für ein solches Organell und die damit einhergehende Kompartimentierung nicht völlig klar: Die in den Peroxisomen vorkommenden Enzyme sind teilweise auch im Zytosol funktionell, was eine Mutante von *H. polymorpha* beweist, die auch ohne Peroxisomen lebensfähig ist (van der Klei und Veenhuis, 1997). Zudem wurden aufgrund des unterschiedlichen Proteininhalts und der damit verbundenen metabolischen Unterschiede (van den Bosch et al., 1992) die Mitglieder der *microbodies* lange nicht als eine zusammengehörende Gruppe identifiziert. Die Wichtigkeit dieses Organelles manifestiert sich beim Menschen z. B. durch einige genetische Funktionsstörungen, die die Peroxisomen betreffen (Moser et al., 1991).

Peroxisomen gehören zur Gruppe der *microbodies*, und ihr Markerenzym ist die Katalase. Das EST-Sequenzierprojekt (*Expressed Sequence Tags*) (Ajioka et al., 1998) in *T. gondii* generierte ca. 10 000 Sequenzen. Durch Homologiesuche wurde ein Gen gefunden, dessen abgeleitete Proteinsequenz Ähnlichkeit mit Katalase hatte. Nach Vorarbeiten in meiner Diplomarbeit stand eine *Katalase*-DNA-Sonde zur Verfügung, die im Labor von J. Ajioka (Department of Pathology, Cambridge, UK) für das *screening* einer *Toxoplasma* Cosmid-Bank, die genomische DNA des RH Stammes enthält, verwendet wurde. Fünf mutmaßlich positive Klone wurden uns zugeschickt. Mit Hilfe der *T. gondii* Katalase sollte festgestellt werden, ob der Parasit im Besitz von Peroxisomen ist. Zugleich stellt die Katalase auch ein wichtiges antioxidatives Enzym dar, dessen Bedeutung erst in jüngster Zeit wieder reges Interesse geweckt hat, nicht zuletzt wegen möglicher Zusammenhänge von pathogenen Zuständen, wie z. B. Krebs, Diabetes, und dem Altern mit dem Auftreten von oxidativem Stress (DeLuca et al., 1995; Feuers et al., 1993). Bisher ist relativ wenig darüber bekannt, wie

T. gondii mit oxidativen Stresssituationen, die sowohl vom eigenen Metabolismus als auch vom Immunsystem des Wirtes herrühren können, fertig wird. Mit der funktionellen Charakterisierung der Katalase sollte auf diese Aspekte näher eingegangen werden.

5.1 Funktionelle Charakterisierung einer Katalase aus *Toxoplasma gondii*

5.1.1 Ermittlung der *T. gondii* Katalase-Sequenz

Die Sequenz der *Katalase* wurde mittels *primer walking* ermittelt, das abgeleitete Protein entsprach längenmäßig anderen typischen Katalasen. Der C-Terminus endet mit dem Tripeptid –AKM, welches dem PTS1 Konsensus-Signal entspricht: Dem Konsensus für das Ur-PTS1 Signal –SKL entspricht ein C-terminales Tripeptid dann, wenn es folgende Kriterien erfüllt: Eine kleine Aminosäure an drittletzter Stelle, es ist also anstelle eines Serins auch ein Alanin oder ein Cystein möglich; eine basische Aminosäure an vorletzter Stelle, statt dem Lysin können hier Arginin oder ein Histidin sein; und am C-Terminus eine hydrophobe Aminosäure, das Leucin kann durch ein Methionin ersetzt werden (Mullen et al., 1997; Purdue et al., 1996). Es sind prinzipiell auch weitere Permutationen dieses konservierten Signals möglich, häufig sind dann aber zusätzliche, weiter stromaufwärts liegende Sequenzen nötig (Mullen et al., 1997; Mullen et al., 1997; Purdue et al., 1996). Die *Toxoplasma gondii* Katalase besitzt nicht das in Pflanzenkatalasen meist beobachtete zweite konservierte PTS1 Signal (–SRL, –SHL) neun Aminosäuren vom Carboxy-Terminus entfernt (Mullen et al., 1997), siehe auch Abb. 4.4, Katalase *alignment* mit *N. tabacum*. Das Vorhandensein eines rudimentären Chloroplasten in diesem Parasiten schließt auch den Erwerb der Katalase durch horizontalen Gen-Transfer nicht aus, ein Vorgang, der in der Natur möglich zu sein scheint (Klotz et al., 1997). Die in der Datenbank von einer Grünalge, *Chlamydomonas reinhardtii*, vorhandene Katalase-Sequenz (*accession number* Y13220) weist, ebenso wie die meisten Pflanzen-Katalasen auch ein zweites konserviertes PTS1 Signal auf: –AKL.

Die Sequenz –AKM wurde in Importstudien, bei denen das Tripeptid an ein Reporterprotein, die Chloramphenicolacetyltransferase, gekoppelt wurde (Swinkels et al., 1992), untersucht, und lokalisierte in CV1-Zellen sowohl in den Peroxisomen als auch im Zytosol.

Weitere Merkmale, die an Abb. 4.4 abzuleiten sind: Es handelt sich bei der *T. gondii* Katalase um eine typische Katalase, und sowohl die Sequenz an sich als auch der *Southern Blot* (Abb. 4.3 B) zeigen, dass es sich nicht um eine Verunreinigung mit Wirtszellen DNA gehandelt hat.

Die abgeleitete Proteinsequenz der aus *T. gondii* klonierten *Katalase*, wie auch die anderen für den Sequenzvergleich verwendeten Katalasen, besitzen die sogenannte Kern- (*core*) Region (Klotz et al., 1997), die bei *S. cerevisiae* Katalase A von Aminosäure 70 bis 460 (Zamocky und Koller, 1999) reicht und circa 390 Aminosäuren umfasst. Deutlich zu sehen ist auch die Divergenz der Sequenzen am N- und besonders am C-Terminus.

Die von von Ossowski *et al.* beschriebene Konsensus-Sequenz, die sogenannte *active site* Sequenz, ist ebenfalls vorhanden (von Ossowski et al., 1993), des weiteren die proximale Häm-Liganden Konsensus-Sequenz.

Dass es sich bei dieser Katalase um ein tetrameres Enzym handelt, wurde von Angelika Herm-Götz, Arbeitsgruppe Soldati, durch einen nativen Lyseaufschluß und anschließender Ultrazentrifugation gezeigt. Die Fraktionen auf einem *Western Blot* mit Anti-*T. gondii*-Katalase Antikörper zeigten, dass die *T. gondii* Katalase aus Tetrameren besteht (Molekulargewicht zwischen 250 und 255 kDa).

Typische Katalasen können durch den Inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazol gehemmt werden, was am distalen Liganden des Häm-Eisens, Histidin 70 (*S. cerevisiae*) liegt, welches auch in *T. gondii* als Histidin 64 vorhanden ist; es markiert das Ende des N-terminalen Arms typischer Häm-Katalasen. Es erlaubt das richtige Binden und Reduzieren eines Peroxidmoleküls; AT bindet kovalent an dieses Histidin. Kaasch und Joiner, die an der gleichen Katalase arbeiteten, konnten zeigen dass die *T. gondii* Katalase durch AT inhibierbar ist (Kaasch und Joiner, 2000).

Wichtige Aminosäuren, die den konservierten Hohlraum bilden in dem sich die prosthetische Gruppe, das Häm, verbirgt (Zamocky und Koller, 1999), sind in der *T. gondii* Katalase vorhanden.

Darüber hinaus besitzt die *T. gondii* Katalase die nötigen Aminosäuren, um fest NADPH zu binden.

Die Sequenz, die Bindung von NADPH und die Bildung eines Tetramers ließ auf die Funktionalität des Enzyms schließen.

5.1.2 Lokalisation der *Toxoplasma gondii* Katalase in der Zelle

Die widersprüchlichen Ergebnisse mit vier verschiedenen Seren gegen die *T. gondii* Katalase in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse konnten durch die Aufreinigung mit den jeweiligen Peptiden nicht aufgelöst werden, und die gereinigten Seren wirkten in der Immunfluoreszenzanalyse irreführend: Wie schon vor der Aufreinigung reagierten alle vier Seren identisch im *Western Blot* (Abb. 4.7 und 4.11), jedoch unterschiedlich in der

Immunfluoreszenzanalyse. Selbst ein nativer *Western Blot* (Abb. 4.13), der eher die Situation in der Immunfluoreszenzanalyse widerspiegeln sollte, zeigte mit den vier Seren das selbe Bandenmuster und keine zusätzlich detektierten Proteine. Dass eine Katalase in einem Apicoplasten residiert, welcher eine der apikalen Strukturen darstellte (Abb 4.8 und 4.12 C) schien unwahrscheinlich. Es gibt zwar ein Beispiel in Spinat, wo eine Katalase in Photosystem II Membranen detektiert wurde (Sheptovitsky und Brudvig, 1996) und bei der es sich tatsächlich um eine typische Katalase zu handeln scheint, sie bildet jedoch Dimere (Zamocky und Koller, 1999). Ein weiteres Problem dieser Lokalisation war, dass Proteine, die vom Kern kodiert werden und im Apicoplasten lokalisieren, ein zweigeteiltes N-terminales Signal besitzen müssen, um zu diesem Organell zu finden: Ein Signal für den sekretorischen Weg sowie, darauf folgend, ein Chloroplasten-Signal (Waller et al., 1998); dieses besondere Signal basiert auf der Tatsache, dass der Apicoplast von vier Membranen umgeben ist (Kohler et al., 1997). Die *Toxoplasma gondii* Katalase besitzt kein solches Signal an ihrem N-Terminus. Eine weitere Möglichkeit wäre gewesen, dass ein stromaufwärts liegendes Exon für diese Signalsequenz kodiert, und dass eine im Zytosol und eine im Apicoplasten lokalisierte Katalase durch alternatives Spleißen entstehen; im *Northern Blot* sind jedoch keine zwei mRNAs zu sehen, die Sonde erkennt nur ein einziges Transkript (s. Abb 4.5).

Es ist natürlich nicht völlig auszuschließen, dass noch ein weiteres Katalase-Gen existiert. Allerdings detektierten Sibley *et al.* durch einen Katalase *assay* im Gel ebenfalls nur eine Katalase in *T. gondii* (Sibley et al., 1986).

Ein geeigneterer Kandidat für ein Peroxisom schien deshalb die nicht mit dem Apicoplasten identische, aber benachbarte Struktur zu sein, die mit einem der Seren detektiert wurde; die Struktur dieser möglichen Peroxisomen war zwar ungewöhnlich, da sie (Abb. 4.12 D) wie aneinanderhängende Kügelchen (perlschnurartig) wirkten, allerdings können Peroxisomen verschiedene Formen wie längliche Vesikel oder sogar die eines peroxisomalen Retikulums annehmen (Lazarow und Fujiki, 1985). Häufig kommen Peroxisomen in enger Nachbarschaft zu Chloroplasten vor, darüber hinaus war diese Struktur bisher noch nicht beschrieben worden und kolokalisierte nicht mit bereits beschriebenen Strukturen (Abb.4.14). Kaasch und Joiner, die am selben Enzym arbeiteten, versuchten den Nachweis der Peroxisomen durch cytochemische Elektronenmikroskopie, bei der mit Hilfe der *T. gondii* Katalase das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) umgesetzt werden sollte, was zu einem Präzipitat führt (Kaasch und Joiner, 2000). Die Autoren präsentieren ein Peroxisom mit dieser Methode, merken jedoch an, dass es keinen Beweis für Membranen gäbe, da die Negativkontrastierung des Präparates ausgelassen wurde, um die Detektion des DAB-Präzipitates zu erleichtern.

DAB ist ein Substrat von Peroxidasen, es kann gleichzeitig verschiedene Organellen markieren, die Peroxidase-Aktivität enthalten. Durch stringente Versuchsanordnungen kann der Versuch so angelegt werden, dass nur die Katalase funktionell ist (Fahimi und Baumgart, 1999). Dass Kaasch und Joiner das Präzipitat auch in Mitochondrien mit dieser Methode detektieren lässt darauf schließen, dass der Ansatz nicht spezifisch für Katalase war, und könnte bedeuten, dass die als Peroxisom identifizierte Struktur (Kaasch und Joiner, 2000) von einer wie auch immer lokalisierten Peroxidase herrührt. Versuche unsererseits, Peroxisomen mittels Immun-Elektronenmikroskopie nachzuweisen, schlugen fehl, sowohl was das Serum #84 („Apicoplast“) als auch was Serum #96 („mögliches Peroxisom“) anbetrifft.

Die Fraktionierungen erbrachten schließlich mehr Klarheit: Die Katalase befindet sich nach der Digitoninfraktionierung zum Großteil im Überstand und ist auch mit der Methode der kruden Fraktionierung hauptsächlich in den zytosolischen Fraktionen lokalisiert.

Es stellte es sich erst nachträglich heraus, dass das als Kontrolle verwendete Protein GRA3, Abb. 4.9 und 4.10, das für die Intaktheit der Dichten Granula bürgen sollte und als löslich galt (Ossorio et al., 1994), eine Transmembrandomäne besitzt und deshalb als Kontrolle ungeeignet ist. Allerdings kann dies nicht davon ablenken, dass die Katalase mit verschiedenen Konzentrationen an Digitonin, die teilweise unter den für Glykosomen verwendeten lagen, immer im Überstand war. Beide Fraktionierungen sind gängige Methoden in *Trypanosoma*, mit denen die *microbody* Membran intakt bleiben sollte. Es müsste sich schon um eine sehr fragile Peroxisomenmembran handeln, wenn sie den Bedingungen mit Digitonin nicht standhielte.

Nachdem die Fraktionierungen nahe gelegt hatten, dass die Katalase zytosolisch ist, wurden Fusionsproteine mit putativen Peroxisomen-Signalsequenzen, namentlich PTS1, und GFP hergestellt (Abb. 4.16). Es wurden drei verschiedene GFP-PTS1 Fusionsproteine hergestellt: Zunächst GFP-AKM, was einem GFP mit dem Tripeptid am C-Terminus der *T. gondii* Katalase entspricht. Da häufig weitere Sequenzen stromaufwärts für ein effizientes Signal notwendig sind (Blattner et al., 1992; Mullen et al., 1997; Mullen et al., 1997; Purdue et al., 1996), wurden die letzten zwölf C-terminalen Aminosäuren der *T. gondii* Katalase an den C-Terminus des GFP gehängt. Um völlig sicher zu gehen, wurde ein GFP-SKL hergestellt, da viele peroxisomale Proteine das effiziente SKL-Motiv tragen (Swinkels et al., 1992). Alle drei GFP-PTS1 Konstrukte erwiesen sich jedoch als zytosolisch, s. Abb. 4.17. Die zytosolische Lokalisation könnte an der Überexpression liegen, eine andere, logischere Erklärung wäre, dass das Signal –AKM ein ineffizientes Signal für den Import in Peroxisomen (Knott et al.,

2000; Swinkels et al., 1992) in *Toxoplasma* darstellt, obwohl es in den PTS1 Konsensus hineinfällt.

Nun gibt es natürlich auch Beispiele mit ineffizientem *targeting* zu den Peroxisomen trotz des Tripeptides –SKL bzw. einer dem Konsensus entsprechenden Sequenz am C-Terminus (Geisbrecht und Gould, 1999; Sacksteder et al., 1999). Dies erklärt allerdings nicht, weshalb keines der GFP-PTS1 Konstrukte eine signifikante Überlagerung mit der von Serum #96 detektierten Struktur zeigte.

Weitere Hinweise für das Importpotential des Tripeptides –AKM kommen von Kaasch und Joiner: Sie exprimierten das Reporterprotein Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) mit dem und ohne das Tripeptid –AKM am C-Terminus transient in CHO-Zellen (*Chinese Hamster ovary cells*); des weiteren wurde die *T. gondii* Katalase transient in CHO Zellen exprimiert, mit und ohne Tripeptid. Die Autoren berichten von einer zytosolischen, diffusen Färbung der Zellen, wenn die Proteine kein Tripeptid am C-Terminus besaßen, und Lokalisation in distinkten Strukturen, die Peroxisomen ähneln (Kaasch und Joiner, 2000). Allerdings wurden keine Doppelimmunfluoreszenzen mit peroxisomalen Proteinen aus CHO-Zellen durchgeführt, mit denen diese Lokalisation relativ zweifelsfrei als peroxisomal hätte definiert werden können. Es scheint zumindest so, als ob das Tripeptid –AKM notwendig und ausreichend ist, um den Import von CAT in CHO-Zellen zu ermöglichen, und dass auch die *T. gondii* Katalase importiert wird.

Diskutabel sind drei Punkte:

Katalasen bilden Tetramere, Hinweise für einen möglichen Zusammenbau des funktionellen Enzyms aus Monomeren im Zytosol werden diskutiert (Brul et al., 1988; Middelkoop et al., 1993; Yamamoto et al., 1988). Die Katalase in humanen Hautfibroblasten assembliert sich im Zytosol zu Tetrameren und wird zum Peroxisom gebracht, wo das Tetramer wieder in Monomere zerfällt und importiert wird (Middelkoop et al., 1993). Des weiteren wird Isocitrat Lyase, die kein PTS1 mehr trägt, von Untereinheiten, die noch ihr PTS1 besitzen, durch Oligomerisierung (sogenanntes „Huckepack“) zu den Glyoxysomen transportiert und entweder als Oligomer, oder, nach dem Zerlegen in Untereinheiten, als Monomer ins Organell importiert (Lee et al., 1997). Es ist also durchaus möglich, dass Heterotetramere zwischen CHO-Zellen Katalase und *T. gondii* Katalase entstanden sind, die den Import der *T. gondii* Katalase, unabhängig von –AKM oder anderen Signalen, ermöglicht hätten. Die endogene CHO-Katalase müßte ausgeschaltet werden, um Klarheit zu bekommen (Purdue et al., 1996).

Der zweite Punkt ist, dass nicht alle Signale in allen *mirobody*-enthaltenden Zellen (gleich) effizient sind: Es sind zwischen unterschiedlichen Organismen, oder Gruppen, wie Tieren, Pflanzen, Pilzen und Trypanosmen starke Unterschiede in der Permissivität der Signale möglich (Mullen et al., 1997), es ist deshalb denkbar, dass das Tripeptid –AKM zwar in CHO-Zellen ausreichend ist, um ein Protein in die Peroxisomen zu transportieren, in *Toxoplasma gondii* jedoch nicht.

Drittens lassen die positiven Importergebnisse in CHO Zellen von Kaasch und Joiner, zusammen mit den in dieser Doktorarbeit gewonnenen und bisher beschriebenen Erkenntnissen aus Fluoreszenzanalysen, GFP-PTS1 Fusionsproteinen und Fraktionierungen in *T. gondii* auch den Umkehrschluss zu Punkt zwei zu, nämlich dass die Katalase in *Toxoplasma gondii* nicht in Peroxisomen lokalisiert, da sie in CHO-Zellen Peroxisomen importiert wird, sich im Parasiten jedoch im Zytosol befindet.

Auch darf nicht vergessen werden, dass selbst Kaasch und Joiner von der *T. gondii* Katalase berichten, dass ein schwaches und diffuses Signal im Zytosol detektiert werden kann, welches spezifisch ist (Kaasch und Joiner, 2000). Die Autoren gehen davon aus, dass es sich um einen zytosolischen *pool* des Proteins handelt. Das Hauptsignal kommt jedoch von einer anterior vom Nukleus sich befindenden, perlschnurartigen Struktur, ähnelt der von uns mit Serum #96 detektierten apikalen Struktur und ist eventuell mit ihr identisch.

Die in dieser Doktorarbeit hergestellten polyklonalen Anti-*T. gondii*-Katalase Seren wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden hergestellt, Kaasch und Joiner verwendeten ein GST-Katalase Fusionsprotein, das in *E. coli* exprimiert wurde und mit dem ebenfalls Kaninchen immunisiert wurden (Kaasch und Joiner, 2000). Das GST-Katalase Fusionsprotein enthielt nicht die gesamte *T. gondii* Katalase Sequenz, sondern nur den C-terminalen Teil von Aminosäure 335-502. Zum Vergleich: Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Peptide erstrecken sich von Aminosäure 399-414 (Peptid 2131) bzw. 423-34 (Peptid 2132). Die Auswahl an immunogenen Sequenzbereichen ist beschränkt (Abb.4.6), und daher ist es nicht allzu verwunderlich, dass sowohl Kaasch und Joiner mit Anti-Protein Antikörpern als auch wir mit Anti-Peptid Antikörpern mit einem der vier Seren ähnliche Strukturen detektieren. Um Klarheit über die Lokalisation zu erhalten, wurde die *T. gondii* Katalase ausgeschaltet.

5.1.3 Ausschalten des *T. gondii* Katalase-Gens

Um die Lokalisation der Katalase und ihre enzymatische Rolle in *T. gondii* zu ermitteln, wurde die *Katalase* durch doppelt homologe Rekombination ausgeschaltet (s. Abb. 4.18). Für das Überleben in der Kultur schien die Katalase nicht notwendig zu sein, da sich sowohl im RH als auch im Prugniaud Stamm *Katalase knock out* Klone erzeugen ließen, Abb.4.19. Die Immunfluoreszenzanalyse war ernüchternd: Sowohl die mit Serum #84 als auch mit Serum #96 (s. Abb.4.8 und 4.12) detektierten apikalen Strukturen waren in dem RH *Katalase knock out* Klon vorhanden, was auf eine Kreuzreaktion der Seren hinweist. Ebenso waren die Verhältnisse im Prugniaud Stamm. Damit wurde klar, dass die zytosolische, zellzyklus-abhängig exprimierte Färbung spezifisch sein muss; diese war jedoch nach dem Aufreinigungsprozess mit keinem der vier Seren in der Immunfluoreszenzanalyse zu sehen, obwohl das Protein im (nativen) *Western Blot* noch detektiert wurde. Es scheinen demnach durch die Aufreinigung der Seren die für die Immunfluoreszenz spezifischen Antikörper verschwunden zu sein, wohingegen die kreuzreagierenden stärker zum Vorschein kamen. Es wurde also, um den *knock out* und die Lokalisation Katalase zu demonstrieren, wieder auf die ungereinigten Seren zurückgegriffen, Abb. 4.20. Zusammengenommen zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass die Katalase in *Toxoplasma* zytosolisch lokalisiert ist.

Eventuell lässt sich sogar im allgemeinen über die Existenz von Peroxisomen in *T. gondii* diskutieren, da selbst GFP-PTS1 Fusionsproteine im Zytosol lokalisieren, Abb. 4.17. Ein weiterer, überzeugenderer Hinweis für die Abwesenheit von Peroxisomen in *Toxoplasma* ist das Fehlen der PEX Gene in der EST-Datenbank von *T. gondii* und der weitaus größeren von *Plasmodium* (PlasmoDB). PEX Gene sind jedoch eine absolute Voraussetzung für die Bildung von Peroxisomen (Purdue und Lazarow, 2001). Eine Suche nach den PEX Proteinen 2, 5, 7, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 hatte keinen oder nur geringsten Erfolg; es existierte keine Trefferquote unter einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} . Ein *blast* mit der *T. gondii* Katalase in der *Plasmodium* Datenbank ergab ein negatives Ergebnis, wohingegen vom apicomplexen Parasiten *Eimeria tenella* ein *Katalase* Contig existiert (aus AI756795 sowie BE027590, P(N) $1,3 \times 10^{-29}$), der mit der *T. gondii* Katalase einem Sequenzvergleich unterzogen werden kann. Erstaunlicherweise endet diese Katalase am vermutlichen 3'-Ende ebenfalls mit einem PTS1-Signal, –SRM.

Von Kaasch und Joiner wurde uns das (offensichtlich nicht-gereinigte) Anti-*T. gondii*-Katalase Serum zur Verfügung gestellt; es detektierte keine apikalen Strukturen und zeigte,

wie unsere Seren, eine zellzyklus-abhängige, zytosolische Expression der Katalase, welche in der *Katalase knock out* Zelllinie verschwunden war.

Es existieren auch eukaryontische Organismen (Pflanzen werden hier nicht in Betracht gezogen, sie besitzen,, wie schon erwähnt, häufig mehrere Katalasen), die zwei Katalasen besitzen, wovon eine peroxisomal, die andere zytosolisch lokalisiert ist: *S. cerevisia* (Izawa et al., 1996), *D. discoideum* (Garcia et al., 2000), *C. elegans* (Taub et al., 1999).

Es wurde sowohl je eine de *S. cerevisiae* Katalasen als auch beide Katalasen ausgeschaltet und mit Wildtyp-Zellen verglichen (Izawa et al., 1996): Die An- bzw. Abwesenheit von Katalase hatte keine Auswirkungen auf die Wachstumsrate unter Bedingungen ohne oxidativen Stress (Izawa et al., 1996) und ähnelt damit dem Phänotyp der *Toxoplasma gondii* Katalase knock out Zelllinien in Zellkultur. Des weiteren wird hervorgehoben, dass die Katalase besonders wichtig für *S. cerevisiae* Zellen ist, die sich in der stationären Phase befinden. Die Schlußfolgerung war, dass Katalase unter physiologischen Bedingungen keine wichtige Rolle spielt, dafür jedoch um so wichtiger in Stresssituationen wird (Izawa et al., 1996). Dies trifft wahrscheinlich auch auf die *T. gondii* Katalase zu.

Auch *Dictyostelium discoideum* ist im Besitz zweier Katalasen, die sowohl räumlich als auch zeitlich unterschiedlich reguliert werden (Garcia et al., 2000). Die Expression der zytosolischen Katalase in den Präsporen hat wahrscheinlich die Funktion, die Zellen während längerer Dormanzphasen vor oxidativem Stress zu schützen (Garcia et al., 2000).

Der Nematode *Caenorhabditis elegans* besitzt ebenfalls zwei Katalasen, die von zwei tandemartigen Genen kodiert werden (Taub et al., 1999). Unter Hungerbedingungen wird ein Dauerstadium der Larve induziert und die Expression der zytosolischen Katalase hochgefahren. Eventuell erfüllt diese Katalase also die Funktion, die Zellen vor oxidativem Schaden während einer langen Dormanzphase zu schützen, auf die dann eine reproduktive Phase folgen soll (Taub et al., 1999). Die Autoren spekulieren auch, dass zytosolische Katalasen eventuell gar keine Seltenheit darstellen und besonders in Zeiten der Nahrungsknappheit benötigt werden.

Zwar besitzt *Toxoplasma gondii* wahrscheinlich nur dieses eine Gen, dennoch scheint die zytosolische Lokalisierung des Enzyms nicht zu außergewöhnlich zu sein. Von parasitären Bakterien ist bekannt, dass sie nur ein Katalase-Gen besitzen (Klotz et al., 1997). Ein weiterer parasitärer Eukaryont, der wahrscheinlich nur eine zytosolische Katalase besitzt, ist der Nematode *Ascaris suum* (Eckelt et al., 1998). Dieser Parasit ist, ebenso wie *T. gondii*, oxidativen Stress durch die Leukozyten des Wirtes ausgesetzt (Eckelt et al., 1998). Hier wird

die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die zytosolische Katalase die Eier vor dem darin entstehenden Wasserstoffperoxid schützt (Eckelt et al., 1998)

Interessant wäre es daher auch, die Rolle der Katalase für das Dormanzstadium von *Toxoplasma gondii*, die Bradyzoiten, zu ergründen, und ob die Katalase für die Dormanz ähnlich wichtige Funktionen hat. Bisher ist noch kein EST, der Ähnlichkeit mit Katalase hat, aus Bradyzoiten aufgetaucht (s. aber auch Abb. 4.24, Enzym-assays und 5.1.4).

5.1.4 Enzymatische Charakterisierung der *T. gondii* Katalase

In einem Enzym-assay wurde untersucht, ob die *T. gondii* Katalase funktionell ist. In diese Untersuchungen wurden auch die *Katalase knock out* Zelllinien sowie die Katalase überexprimierende Zelllinie und der komplementierte *Katalase knock out* mit einbezogen (die letzere Zelllinie ist in der Tat auch Katalase-überexprimierend). Die Messungen bewiesen, dass die *Toxoplasma gondii* Katalase enzymatisch aktiv ist, Abb.4.24; die *knock out* Zelllinien besitzen eine leichte Hintergrund-Aktivität, die durch die Verwendung von kruden Zellextrakten und der darin enthaltenen Antioxidantien begründet werden kann. Außerdem könnte es sich um die Aktivität von noch in geringen Mengen vorhandenen Wirtszellenzymen handeln.

Die Ergebnisse des *Western Blots* Abb. 4.22, legten nahe, dass die beiden Katalase-überexprimierenden Zelllinien (RHKatov und RHKatomp) ca. die zehnfache Menge an Katalase exprimieren. Dies schlug sich jedoch nicht in der spezifischen Aktivität nieder, was eventuell an der Menge an exprimierter Katalase liegt, so dass die richtige (funktionelle) Faltung nicht völlig gewährleistet ist. Eventuell steht auch nicht genügend Häm bzw. NADPH zur Verfügung. Ein Zusammenhang von Häm-Defizienz und dem Herunterregulieren der Katalase-Expression wurde in *S. cerevisiae* gezeigt (Skoneczny und Rytka, 2000), woraus geschlossen werden kann, dass im Normalfall dafür gesorgt wird, dass beide Bestandteile in den richtigen Mengen vorliegen.

Das Vorhandensein eines hemmenden Bestandteils im Extrakt ist auszuschließen, da die käufliche Katalase, wenn sie in eine Küvette mit *knock out* Extrakt gegeben wurde, die gleiche Aktivität zeigte wie ohne Vorhandensein von Extrakt. Durch die relativ hohen Standardabweichungen wird deutlich, dass die Messungen stark schwanken konnten. Interessant auch dass die spezifische Aktivität im Prugniald-Stamm signifikant höher liegt als im RH (Wildtyp): RH $152 \pm 18,9$ U/mg, Prugniald: $215,2 \pm 25,5$ U/mg was auf eine Rolle der Katalase während der Dormanz schließen lassen könnte. Hierbei muss bedacht werden, dass nur ca. 30 % der Zellen in diesem Stamm als Bradyzoiten (Dormanzstadium) vorliegen. Im

Vergleich mit anderen Katalasen (ebenfalls krude Zellextrakte) befindet sich die *T. gondii* Katalase im oberen Bereich: Bei *C. elegans* (Taub et al., 1999) erfolgte der Aufschluß mittels *glass beads*, die spezifische Aktivität lag unter 10 U/mg, wobei meist beide Katalasen in die Messung einfließen (abhängig vom Alter des Wurms).

Die Zellextrakte von *D. discoideum* wurden wie die *T. gondii* Extrakte mit 0,1 % Triton X-100 aufgeschlossen, auch der *assay* entsprach der unter 3.8.1 genannten Methode; es wurden Werte zwischen ca. 40 und 80 U/mg erzielt, wobei es sich teilweise um beide Katalasen oder nur um die peroxisomale Katalase handelte (Garcia et al., 2000).

Die mittels *glass beads* hergestellten Zellextrakte von *S. cerevisiae* zeigten für den Wildtyp eine spezifische Aktivität von $1,32 \pm 0,28$ U/mg.

Zellextrakte von *A. suum* zeigten eine spezifische Aktivität von 22 ± 2 U/mg.

Sibley *et al.* führten enzymatische Messungen mit der *Toxoplasma gondii* Katalase durch (Sibley et al., 1986) und erzielten spezifische Aktivitäten von $16,9 \pm 0,9$ U/mg mit Extrakten des RH Stammes. Zum Vergleich: Die hier verwendeten RH Extrakte (RH aus Vero-Zellen) ergaben eine ca. 10-fach höhere spezifische Aktivität. Der Enzym-*assay* ist dem in dieser Doktorarbeit verwendeten ähnlich, allerdings gibt es auch Unterschiede: Sibley *et al.* testeten mehrere pH-Werte, namentlich pH 4,0 bis pH 10, auf die der Puffer, 50 mM PBS, eingestellt wurde und zu dem dann das H₂O₂ zugegeben wurde (Sibley et al., 1986). Die Autoren berichten von einem pH Optimum von 7,8, in unserem *assay* wurde ein 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 hergestellt. Des weiteren wurden bei dem in dieser Doktorarbeit verwendeten Katalase Enzym-*assay* ca. 60 µl H₂O₂ (30 %) zu 50 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer gegeben, Sibley *et al.* geben jedoch 100 µl für das selbe Volumen 50 mM PBS, an, so dass es möglich ist, dass sich durch eine zu hohe Substratkonzentration die inaktive *Compound III* gebildet hat (siehe Abb.1.3), was zu niedrigeren Aktivitäten führt. Die Extraktbereitung erfolgte ebenfalls mit 0,1 % Triton X-100 in 50 mM PBS Puffer, pH 7,8, allerdings wurde anschließend noch sonifiziert (Sibley et al., 1986), was eventuell ebenfalls zu Beeinträchtigungen der Katalase-Aktivität geführt hat. Zudem entspricht bei Sibley *et al.* 1 *Unit* $1,15 \mu\text{mol}/\text{min}$ (anstelle von $1 \mu\text{mol}/\text{min}$).

Murray und Cohn stellten ebenfalls *T. gondii* Extrakte her, indem die Zellen einer hypotonen Lyse in Wasser unterzogen wurden (Murray und Cohn, 1979). Die resultierende Aktivität nach der Methode von Baudhuin bei 0°C (Baudhuin et al., 1964) waren $5,7 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ BU mit 1 Million Parasiten (Baudhuin Units), was, folgt man den Angaben über die Kontrolle, umgerechnet ca. 1,6 U/mg (Gesamtprotein) entsprechen sollte (Murray und Cohn, 1979).

Eventuell hat die spezielle Durchführung des *assays* mit einer Temperatur bei 0°C Anteil an den Unterschieden mit den in dieser Arbeit durchgeführten Katalase Enzym-*assays*.

5.1.5 Enzymatische Messung der Glutathion-Peroxidase (GPx) Aktivität

Es sollte überprüft werden, ob ein anderes antioxidatives Enzym, die Glutathion-Peroxidase, das Fehlen der *T. gondii* Katalase kompensiert. Hierfür wurden die selben kruden Zellextrakte wie für den Katalase Enzym-*assay* verwendet. Mit den Zellextrakten war jedoch keine Glutathion-Peroxidase Aktivität mit Cumolhydroperoxid als Substrat in den Katalase-defizienten bzw. sonstigen Zelllinien meßbar. Izawa *et al.* hatten in *S. cerevisiae* als möglichen Kandidaten, der die Defizienz von Katalase ausgleichen sollte, die Cytochrom C-Peroxidase in Betracht gezogen (Izawa *et al.*, 1996). Ihre Aktivität in Katalase-defizienten *S. cerevisiae* unterschied sich fast gar nicht von der im Wildtyp (Izawa *et al.*, 1996). In *D. discoideum* werden beide Katalase-Gene unabhängig voneinander reguliert, darüberhinaus kompensiert die zytosolische Katalase nicht bei Abwesenheit der peroxisomalen Katalase, und die Zellen sind deshalb auch 160-fach empfindlicher gegenüber Wasserstoffperoxid (Garcia *et al.*, 2000). Es scheint daher nicht einfach zu sein, auf Anhieb einen Kandidaten für die Kompensation der Katalase-Defizienz zu finden. Allerdings verdichten sich mittlerweile die Hinweise, dass einige als Glutathion-Peroxidasen identifizierte Enzyme nicht Glutathion, sondern Thioredoxin als Substrat benötigen. Ein Beispiel hierfür ist die GPx in *T. brucei* (R. L. Krauth-Siegel, persönliche Mitteilung), ein Enzym, von dem bis vor kurzem angenommen wurde, dass es in Trypanosomen überhaupt nicht existiert (3 Gene wurden bisher kloniert), sowie die monomere GPx aus *P. falciparum* (Sztajer *et al.*, 2001). Die GPx aus *P. falciparum* reagiert schneller mit Thioredoxin als mit GSH, die Reaktion wird am effizientesten, wenn das Thioredoxin aus *Plasmodium falciparum* verwendet wird. Allerdings weisen die Daten - geringe Effizienz, Spezifität für Thioredoxin - darauf hin, dass das Enzym nicht unbedingt eine antioxidative Funktion hat, sondern eher eine Rolle in der Redox-Regulierung von Gen-Expression und Differenzierungsprozessen spielt. (Sztajer *et al.*, 2001). Dies sollte bei weiteren *assays* ebenfalls in Betracht gezogen werden. *P. falciparum* besitzt ein funktionelles Thioredoxin-System (Krnajski *et al.*, 2001). Mit dem *P. falciparum* Thioredoxin (AF202664) wurde ein *blast* in der *Toxoplasma* Datenbank durchgeführt, wo ein Contig aus 12 ESTs ein putatives *Thioredoxin* darstellen könnte, P (N) $3,5 \times 10^{-27}$, das sogar das Thioredoxin Motiv CysGlyProCys (Krnajski *et al.*, 2001) besitzt, wobei es sich um die beiden aktiven Cysteine handelt. Ein weiterer Contig mit einem P (N) $< 10^{-10}$ lässt eventuell auf ein weiteres *Thioredoxin* schließen, Zellen besitzen häufig mehrere verschiedene Thioredoxine (Krnajski

et al., 2001). Mit einem P (N) $\sim 10^{-10}$ kann durch einen *blast* in der *Toxoplasma. gondii* *Clustered EST Database* mit der *P. falciparum* GPx (CAA92396) ein Contig (aus den beiden ESTs AA520892 bzw. AA531754) detektiert werden, wobei es sich allerdings um Bradyzoiten cDNA handelt. Die stadienspezifische Expression der GPx mag ein weiterer Grund für die Nicht-Detektierbarkeit des Enzyms in den kruden Extrakten sein, auch wenn im Prugniuad Stamm ein gewisser Prozentsatz der Parasiten im Bradyzoiten-Stadium sein sollte. Eventuell ist die GPx ein dormanzspezifisches Enzym. Hinweise für eine *Glutathion-Reduktase* in *T. gondii* (Tachyzoiten) befinden sich unter der *accession number* AAB96971; bei einem *blast* mit der Plasmodien Thioredoxin-Reduktase in der *T. gondii* Datenbank findet sich ein EST (W00127) mit P(N) $<10^{-10}$, die abgeleitete Sequenz wird jedoch als Glutathion-Reduktase deklariert. Die Verifizierung, um welche Proteine es sich genau handelt, und welche Funktion sie haben, bleibt also noch offen.

5.1.6 Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid

Da die Katalase-defizienten Toxoplasmen unter physiologischen Bedingungen in der Zellkultur lebensfähig sind, wurden die Zellen oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid ausgesetzt. *T. gondii* gilt als extrem widerstandsfähig gegen hohe Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (Murray und Cohn, 1979). Murray und Cohn berichten, dass fast die Hälfte der Parasiten nach einer Inkubation bei einer Konzentration von 10^{-2} M H_2O_2 für 1 h noch lebensfähig waren. Zudem stellte sich heraus, dass hauptsächlich $\bullet OH$ und 1O_2 für das Abtöten von Toxoplasmen wichtig sind und das Superoxid-Anion sowie das Wasserstoffperoxid als Vorläufer daher eine wichtige Rolle spielen (Murray und Cohn, 1979). Für die Behandlung der Toxoplasmen mit Wasserstoffperoxid wurde offensichtlich PBS, pH 7,4 verwendet und nach der Inkubation die Lebensfähigkeit der Parasiten mit Acridinorange unter dem Mikroskop überprüft (Murray und Cohn, 1979). Murray and Cohn berichten, dass sich für 1 h mit 10^{-3} M H_2O_2 behandelte Zellen anschließend normal in nicht aktivierten Makrophagen teilten (Murray und Cohn, 1979). Eventuell ergibt sich ja bei der Überprüfung der Lebensfähigkeit durch Acridinorange ein Unterschied zu den in dieser Doktorarbeit gewonnenen Daten, bei denen die Auswertung des Experimentes nach 48 h erfolgte. Mit der hier verwendeten Methode gab es selbst in den Katalase-überexprimierenden Zelllinien keine Überlebenden mit 10^{-2} M H_2O_2 , Abb.4.25. Darüberhinaus erhält man durch die Behandlung mit einer Konzentration von 10^{-3} M H_2O_2 nur in den Katalase-überexprimierenden Zellen wenige Überlebende (d.h. Vakuolen ≥ 4 Parasiten in % von unbehandelten Zellen). Für 1 h mit 5×10^{-3} M Wasserstoffperoxid behandelte *D. discoideum* Zellen sterben nicht sofort, d.h.

sie nehmen den Farbstoff Phloxin B auch einige Stunden nach der Behandlung nicht auf, nach 24 h tun sie dies jedoch sehr wohl (Garcia et al., 2000), und 93,1 % der Zellen erweisen sich somit als tot (Garcia et al., 2000). Solch ein Phänomen mag auch der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse von Murray und Cohn sein, die die Lebensfähigkeit der Parasiten direkt nach der Behandlung durch Acridinorange überprüften. Garcia *et al.* berichten, dass nach 24 h nur 2,2 % der mit 5×10^{-4} M H_2O_2 für 1 h behandelten wachsenden *D. discoideum* Zellen den Farbstoff Phloxin B aufnehmen, obwohl ein transientes Stoppen des Zellzyklus erfolgt, der nach 24 h wieder aufgenommen wird, so dass sich die Zellen wieder in normaler Rate zu teilen beginnen (Garcia et al., 2000). Zellzyklus-Arrest durch oxidativen Stress ist ein auch in Hefe und Säugern beobachtetes Phänomen (Lee et al., 1996; Leroy et al., 2001; Wiese et al., 1995). Deshalb wurden die mit Wasserstoffperoxid behandelten *T. gondii* Klone erst 48 h nach der Behandlung fixiert.

Aus Abb. 4.25 wird deutlich, dass die Katalase-defiziente Zelllinie empfindlicher ist als der Wildtyp: Bei einer Konzentration von 5×10^{-5} M waren fast alle Zellen tot. Zudem ist ersichtlich, dass die zusätzliche Katalase in RHKatomp und RHKatov zu einer höheren Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid führt, auch wenn eventuell ein Teil nicht-funktioneller Katalasen gebildet werden sollte.

Bei der Diskussion der Daten darf nicht vergessen werden, dass *Reactive Oxygen Species* immer mehr als spezifisch wirkende *second messenger* wahrgenommen werden (Finkel, 1998; Sauer et al., 2001). Eine Hauptrolle spielt dabei das Wasserstoffperoxid, welches wahrscheinlich hauptsächlich durch eine an der Membran befindliche NADPH-Oxidase via Produktion des Superoxid-Anions und dessen Dismutation entsteht (Finkel, 1998; Sauer et al., 2001). ROS entstehen z. B. durch die Stimulation mit diversen Liganden wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die über Tyrosin-Kinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren wirken. Dies führt zur Aktivierung der schon erwähnten NADPH-Oxidase. Welches die Zielsubstanzen der ROS sind, ist weitgehend unerforscht: Eine Möglichkeit wären die Tyrosinphosphatasen, da sie in ihrem aktiven Zentrum ein Cystein tragen, das redoxabhängig reguliert werden kann (Hecht und Zick, 1992). Dies wäre eine Analogie zur Proteinphosphorylierung, nur dass nicht bestimmte Tyrosine bzw. Serine modifiziert werden, sondern redox-sensitive Aminosäuren wie Cysteine und Histidine. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Behandlung von Zellen mit moderaten Mengen an Oxidantien den Zellzyklus sowie die Expression von Wachstums-gekoppelten Genprodukten anregt.

Diese Wirkungen können durch Antioxidantien (wie auch Katalase, (Brown et al., 1999)) unterbunden werden. Darüber hinaus können Transkriptionsfaktoren direkt von ROS reguliert

werden, wie z. B. NF- κ B (Schreck et al., 1991), zudem scheint die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA redox-abhängig reguliert zu sein, z. B. durch die Änderung des Redoxzustandes von Cysteinen in der DNA-bindenden Domäne mittels Thioredoxin (Xanthoudakis und Curran, 1992). Da bisher in *T. gondii* keine Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden und die Katalase darüberhinaus zellzyklus-abhängig reguliert wird, sind solche Zusammenhänge von besonderem Interesse.

Auffallend auch, dass der Wildtyp bei einer Konzentration von 10^{-5} M H_2O_2 eine höhere Anzahl Vakuolen hatte als die unbehandelten Zellen. Dies bestätigt die Beobachtung, dass ROS als *messenger* funktionieren können und stimulierend auf den Zellzyklus und die Zellteilung wirken. Diese Wirkungen entfalten sie auch in Abwesenheit der Katalase, da selbst die Katalase-defiziente Zelllinie ein höhere Anzahl Vakuolen aufweist als unbehandelte Zellen, allerdings prozentual weniger als der Wildtyp, was für eine wichtige und regulierende Wirkung der Katalase spricht:

Bei RHKatov und RHKatomp sind diese Effekte nicht zu beobachten, vielleicht können ROS durch die hohe Katalasemenge diese Funktion nicht ausüben, oder aber die Katalase-Menge der Zellen ist nicht kontraproduktiv, sondern steigert die Viabilität, und die Zellen sind schon ohne Stimulus maximal aktiviert. In der Zellkultur waren zwischen Katomp und Katov sowie den Wildtyp Zellen keine offenkundigen Unterschiede zu sehen. Betont werden muss auch, dass in den beiden Katalase-überexprimierenden Zelllinien durch die Verwendung eines konstitutiv exprimierten Promotors die Katalase nicht mehr zellzyklus-spezifisch reguliert wird, was ebenfalls zu Unterschieden in der Reaktion gegenüber Wasserstoffperoxid führen kann. Um Unterschiede in der Viabilität auszuschließen, wurden eigens die Anfangswerte 100 % gesetzt, über die absolute Menge der Toxoplasmen wird in Abb. 4.25 nichts ausgesagt.

Auch ist direkt keine Aussage über die Stimulierung der Zellteilung bzw. einer Beschleunigung des Zellzyklus machbar, da die Zellen nach 48 h fixiert und Vakuolen mit einem Inhalt ≥ 4 Vakuolen gezählt wurden. Dies hatte den Grund, dass es sich bei diesen Vakuolen nicht um eine Zweitinfektion handeln sollte und zunächst eine grobe Abschätzung über die Rolle der Katalase unter oxidativen Stressbedingungen gewonnen werden sollte. Es müsste somit nach unterschiedlichen Zeitpunkten die Zellen fixiert und gezählt werden, wie z. B. nach 6 h, 12 h,..., um zu überprüfen, ob ein Anhalten des Zellzyklus erfolgt oder ob z. B. durch die Zugabe von moderaten Mengen an H_2O_2 die Dauer des Zellzyklus verkürzt wird. Dann wäre auch eine Aussage darüber machbar, ob Wildtyp und Katalase-defiziente Zelllinien mit einer Behandlung von 10^{-5} M H_2O_2 deshalb mehr Vakuolen besitzen, weil diese

auf einer Zweitinfektion von schnell proliferierenden Toxoplasmen beruht, die ihre erste Wirts-Zelle schon lysiert haben, oder ob auf den Reiz hin Gene aktiviert wurden, die die Viabilität an sich verbessern. Die Bestimmung der Parasitenzahl/Vakuole wäre daher von Vorteil. Auch sollten die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert werden und einer Immunfluoreszenzanalyse mit Anti-*T. gondii*-Katalase-Serum unterzogen werden, um zu sehen, ob auf den Stimulus hin alle Vakuolen eine gleichmäßige Katalase-Expression zeigen. Dass die Katalase-überexprimierenden Zelllinien bei höheren H₂O₂ Konzentrationen noch überlebensfähig sind, lässt sich dadurch begründen, dass ROS einander widersprechende Funktionen haben: Sie spielen wahrscheinlich auch eine Rolle in der Apoptose (Jacobson, 1996), die durch Zugabe von Antioxidantien teilweise verhindert werden kann (Finkel, 1998). Bei weiteren Experimenten zur Klärung der Rolle einer zellzyklusspezifischen Katalase in dem delikaten Gleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien in *T. gondii* ist diese duale Funktion mit einzubeziehen.

Die Experimente weisen jedoch darauf hin, dass die Katalase in *T. gondii* bei starkem oxidativen Stress protektive, bei stimulierendem Stress jedoch regulative Funktionen hat.

5.1.7 Untersuchung der Katalase-defizienten Toxoplasmen im Mäusemodell

In diesem Versuch sollte die Rolle der Katalase als Virulenzfaktor experimentell ermittelt werden. Hierzu wurden Katalase-defiziente Parasiten des Prugniaud Stammes hergestellt, als Kontrolle wurden Toxoplasmen verwendet, die zwar den Vektor (mitsamt der Resistenzkassette) integriert hatten, jedoch noch Katalase positiv waren.

Im der dritten Versuchsdurchführung wurde noch der mit Katalase cDNA komplementierte *knock out* Klon PrKatKomp mitverwendet.

Die überlebenden Mäuse wurden nach 4-5 Wochen auf Anti-*T. gondii* Serologie getestet, und alle erwiesen sich als infiziert. Die Versuchsdurchführung 1 erschien vielversprechend, starben doch weniger Mäuse, die mit der Katalase-defizienten Prugniaud Zelllinie infiziert worden waren, und auch zeitlich verzögert, s. Abb. 4.27. Versuchsdurchführung 2 zeigte fast nur noch den Effekt eines zeitlich verzögerten Todes der mit Katalase-defizienten Parasiten infizierten Mäuse im Vergleich zur Kontrolle. Durch Versuchsdurchführung 3 wurde zweierlei ersichtlich: Durch die Verwendung der komplementierten Zelllinie, die sich wie die Kontrolle verhielt, wurde deutlich, dass die beobachteten Unterschiede tatsächlich im Ausschalten des Katalase-Gens begründet zu sein scheinen; Versuchsdurchführung 3 zeigte außerdem, dass trotz Verwendung einer 10x höheren Parasitenzahl für die Infektion der Mäuse mit den Katalase-defizienten Parasiten im Vergleich zu den Kontrollmäusen (mit

PrKatkon bzw. PrKatkomp infiziert) keine Maus verstarb. Die Verwendung geringerer Parasitenzahlen zur Infektion der Kontrollmäuse führte dazu, dass insgesamt weniger Mäuse verstarben. Allerdings ist auch bei Versuchsdurchführung 1 keine tote Maus bei einer Konzentration von 1×10^4 Parasiten zu verzeichnen, obwohl sogar eine Maus mit einer geringeren Parasitenlast (2500 Parasiten) verstorben war. Um die richtige Parasiten-Dosis zu finden, wurden je 3 bzw. 2 verschiedene Mengen an Parasiten intraperitoneal infiziert. Nicht immer korreliert dabei die Menge der gestorbenen Mäuse mit der Menge an für die Infektion verwendeten Parasiten (dies wurde auch von anderen Mitarbeitern, Lai-Yu Kwok und Dr. Susan Brecht, unabhängig und mit anderen Zelllinien, beobachtet). Das Ausschalten des Katalase-Gens scheint jedenfalls Auswirkungen auf die Pathogenität zu haben, und weitere Versuchsdurchführungen sind notwendig, um dies zu bestätigen. Nischik *et al.* versuchten Virulenzfaktoren in Mäusen von Typ I-Linien von *T. gondii* zu finden (Nischik et al., 2001). Hierzu wurden durch wiederholtes Passagieren der Parasiten in der Zellkultur eine Attenuation erreicht. Dadurch verloren die Parasiten ihre akute Virulenz, was sich durch die Verwendung einer 1000-fach höheren Parasitendosis im Vergleich zu nicht attenuierten Parasiten verdeutlichte. In der Zellkultur hatten diese Parasiten keine Schwierigkeiten und entwickelten sich normal (Nischik et al., 2001). Es stellte sich heraus, dass Katalase zu den Proteinen gehört, deren Menge in den attenuierten Parasiten im Vergleich zu den nicht-attenuierten Parasiten vermindert war. Die Autoren postulieren, dass diese Proteine, also auch die Katalase, eine Rolle in der akuten Virulenz spielen (Nischik et al., 2001).

Da der RH Stamm zur Typ I-Linie der hochvirulenten Stämme gehört, böte es sich an, die RH Katalase-defiziente Zelllinie im Mäusemodell auszutesten. Murray *et al.* berichten, dass menschliche Monozyten und aktivierte Makrophagen in der Lage sein müssen, große Mengen an ROS zu erzeugen, um eine effiziente Abwehr-Funktion gegenüber *T. gondii* auszuüben. Durch Zugabe von Antioxidantien wird diese Funktion fast vollkommen ausgeschaltet, obwohl es auch ROS-unabhängige Mechanismen gibt, um gegen den Parasiten anzugehen (Murray et al., 1985). Ähnliche Erkenntnisse wurden auch aus Makrophagen von Mäusen gewonnen, wo die Ausschüttung von Hydrogenperoxid für die Aktivität gegenüber Toxoplasmen eine große Bedeutung hat (Murray et al., 1979). Die Ausstattung mit antioxidativen Enzymen ist daher extrem wichtig für *T. gondii*.

Auf eine weitere antioxidative Enzymgruppe, die Peroxidoxine (Pxn), wurde deshalb noch näher eingegangen, siehe Abb. 5.1 und Abschnitt 5.2.

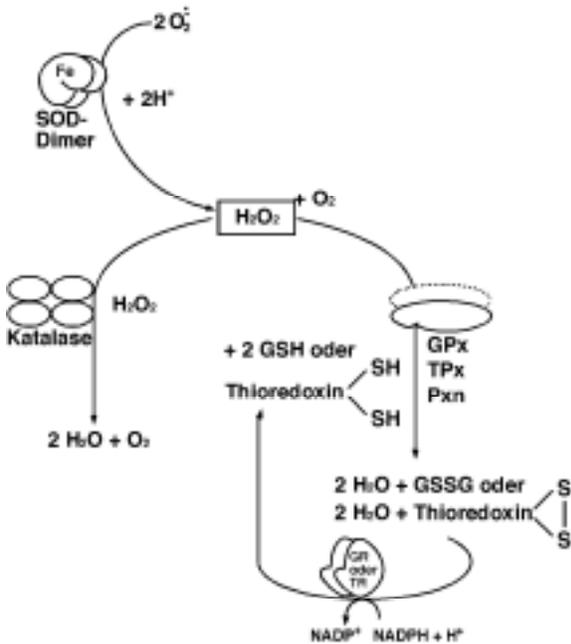


Abb. 5.1 Vereinfachte Übersicht über das antioxidative Netz in *Toxoplasma gondii* gemäß dem derzeitigen Wissensstand: Eine dimere FeSOD (Superoxid-Dismutase), die sowohl in Tachy- als auch in Bradyzoiten exprimiert wird, [Odberg-Ferragut, 2000 #60] (Aktivität noch nicht geprüft) dismutiert zwei Moleküle Superoxid-Anion zu Wasserstoffperoxid, das wiederum von einer tetrameren Katalase zu Wasser und Sauerstoff dismutiert werden kann. Der rechte Zweig der Wasserstoffperoxid-Detoxifizierung ist noch nicht vollständig erschlossen, der Oligomerisierungszustand der Enzyme wurde hier bewusst offen gelassen; zudem sind diese Proteine meist in der Lage, verschiedene Peroxide zu detoxifizieren. GPx: Glutathion-Peroxidase, TPx Thio-redoxin-Peroxidase, Pnx: Peroxidoxin. GR: Glutathion-Reduktase, TR: Thio-redoxin-Reduktase.

5.2 Peroxidoxine

Die Peroxidoxine sind besonders bei Parasiten von großem Interesse, da vielen dieser Organismen antioxidative Enzyme fehlen, wie z. B. die Katalase in Plasmodien (McGonigle et al., 1998). Zudem sind antioxidative Enzyme bzw. Enzymsysteme häufig in Redundanz vorhanden, wie das Glutathion-Peroxidase- und das Thio-redoxin-Peroxidase-System sowie die Katalase, wobei oft ähnliche Funktionen übernommen werden können, wenn eines der Systeme ausfällt. In *S. cerevisiae* wird z. B. durch das Ausschalten der Thio-redoxin-Peroxidase (*TSA*, *Thiol specific antioxidant*), einem 2-Cys Peroxidoxin, die Wasserstoffperoxid-vermittelte Induktion der Katalase T Expression im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Ross et al., 2000).

Deshalb wurden in dieser Doktorarbeit zwei Gene dieser Enzymgruppe kloniert und untersucht. Die 2-Cys Peroxidoxine aus *P. falciparum* besitzen die höchste Sequenz-Ähnlichkeit mit Pflanzen-Peroxidoxinen (Kawazu et al., 2001; Krnajski et al., 2001), das in dieser Doktorarbeit klonierte *T. gondii* Protein zeigt bei einem *blast* in der GenBank größte Ähnlichkeit mit einem humanen Peroxidoxin, an sechster Stelle folgt das einer Pflanze; das 1-Cys Peroxidoxin zeigt größte Ähnlichkeit mit einem 1-Cys Peroxidoxin aus der Ratte.

Die Sequenz für das 2-Cys Peroxidoxin (interne Bezeichnung *Pxn1*, da es als erstes Peroxidoxin in *T. gondii* beschrieben wurde) wurde in der Datenbank gefunden (AF305718) und anhand dieser Sequenzinformation mittels PCR kloniert. In der Zelle konnte das Pxn1Ty

im Zytosol lokalisiert werden, Son *et al.* konnten dieses Protein mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers ebenfalls im Zytosol der Zelle nachweisen (Son et al., 2001). Das Enzym wurde nicht auf seine Funktionalität getestet, allerdings soll das Protein durch Behandlung intrazellulärer Parasiten mit Artemisinin (1 µg/ml), einem Endoperoxid (Kapetanaki und Varotsis, 2001), höher exprimiert werden (Son et al., 2001).

Das Pxn1Ty war einige Zeit nach der Transfektion auf Proteinebene nicht mehr so stark detektierbar wie am Anfang, es muss also im Laufe der Zeit herunterreguliert worden sein. Ob sich hieraus Rückschlüsse auf die Funktion des Enzyms ziehen lassen, ist unklar; eventuell ist das (endogene) Protein jedoch genauestens reguliert und lässt keine Überexpression zu.

Die starke Überexpression des 1-Cys Peroxidoxin als Pxn2Ty blieb jedoch während der Kultivierung der Toxoplasmen erhalten, und das Protein war in der *freeze and thaw* Methode sowohl im Überstand als auch in der Pellet-Fraktion vorhanden, was auch für das Pxn1Ty zutrifft. Die partielle Lokalisation im Pellet mag an der Überexpression liegen, was zur Bildung von Aggregaten führt, die nicht mehr löslich sind, deutet eventuell aber auch eine Assoziation mit Membranen an.

Zudem ist in der Überstand-Fraktion von Pxn2Ty eine ca. 68 kDa Bande zu sehen, die einem Pxn2Ty Dimer entsprechen könnte, obwohl es sich um eine reduzierende SDS-PAGE handelt, was auch schon bei anderen Peroxidoxinen beobachtet wurde (Lee et al., 2000), Abb. 4.32 B, die Bande ist auch in Abb. 4.32 A im Totallysat erkennbar.

Da der *Blot* aus Abb. 4.32 B nach dem Strippen mit dem Serum (#1129) gegen das endogene *T. gondii* Protein Pxn2 inkubiert wurde, lassen sich anhand der Bandenintensitäten (Abb. 4.33 C) Unterschiede erkennen. Auch hier befindet sich ein Teil der Proteine – Pxn2Ty und endogenes Pxn2 – im Pellet, die Menge scheint jedoch sehr viel geringer, als in Abb. 4.32 B mit dem rekombinanten Pxn2Ty, detektiert mit dem Anti-Ty-*tag* Antikörper, beobachtet.

Betrachtet man die Abbildung 4.32 B, so sind allgemein die Bandenintensitäten des Pxn2Ty viel stärker mit dem Anti-Ty-*tag* Antikörper als mit dem Serum #1129, Abb. 4.33 C (Serum #1129 sollte aber auch das rekombinante Pxn2Ty erkennen). Dies liegt wahrscheinlich an der Affinität des Anti-Ty-*tag* Antikörpers zu seinem Epitop, könnte aber auch darin begründet sein, dass aufgrund konformationeller Unterschiede das Pxn2Ty nicht so gut von dem polyklonalen Anti-*T. gondii*-Pxn2 Antikörper (#1129) detektiert wird. Auch das zuvor detektierte Pxn2Ty Dimer ist allenfalls zu erahnen. Bei den übrigen vorhandenen, über 50 kDa liegenden Banden in Abb. 4.33 C, die auch im Wildtyp-Extrakt detektiert werden, könnte es sich um verschiedene Oligomere handeln. Darüber hinaus ist die Oligomerisierung

eventuell auch für die unterschiedliche Zugänglichkeit und damit einhergehende Detektierbarkeit mit den Antikörpern verantwortlich.

Interessant ist die Lokalisation in der Immunfluoreszenzanalyse: Das Pxn2Ty zeigt außer der zytosolischen Lokalisation auch eine Plasma- oder Alveolarmembranlokalisation des Proteins, Abb. 4.34 B. Das Protein besitzt keine vorhergesagten Transmembrandomänen, wenn auch das N-terminale Ende noch nicht zweifelsfrei bestimmt ist. Eventuell ist das Pxn2Ty auch mit der Plasma- bzw. der Alveolarmembran assoziiert, was ebenfalls das Vorhandensein in der Pelletfraktion erklären würde. Die Immunfluoreszenzanalyse mit dem Anti-*T. gondii*-Pxn2 Serum #1129 weist jedoch eher auf eine zytosolische Lokalisation des endogenen Pxn2 und des rekombinanten Pxn2Ty hin, Abb.4.34 C (c und f). Dabei darf nicht vergessen werden, dass es sich noch nicht um das endgültige Serum handelt, das eventuell noch nicht spezifisch genug ist (siehe Abb 4.33 B) und noch der Aufreinigung bedarf. Eine zytosolische Lokalisation von Pxn1 und Pxn2 würde dafür sprechen, dass die Peroxidoxine möglicherweise in der Lage sind, die Funktion einer zytosolischen Katalase zu übernehmen, wenn diese ausgeschaltet wird.

Eine (Plasma- oder Alveolar-) Membranlokalisation von Pxn2 ist auch aus folgenden Gründen nicht auszuschließen: Es gibt Hinweise dafür, dass das 1-Cys Peroxidoxin aus *T. gondii* noch eine weitere, möglicherweise zusätzliche Funktion haben könnte: Die einer Phospholipase A2. Kurz vor dem redoxaktiven Cystein, Cys47, Abb. 4.30, befindet sich die Sequenz GX SXG (Aminosäuren 30-34), welche dem Konsensus für Serin-Hydrolasen mit diverser Substratspezifität, wie z. B. Proteasen und Lipasen, entspricht (Tang et al., 1997). Chen *et al.* konnten zeigen, dass ein humanes 1-Cys Peroxidoxin in der Lage ist, sowohl als Phospholipase A2 als auch als antioxidatives Enzym zu wirken (Chen et al., 2000). Die dortige Konsensus Sequenz, GDSWG, entspricht genau der *T. gondii* Pxn2 Sequenz. Eine (Kalzium-unabhängige) Phospholipase A2-Aktivität wurde in *Toxoplasma* Extrakten nachgewiesen (Gomez Marin et al., 1996; Saffer und Schwartzman, 1991). Eine Phospholipase A2 wird allgemein von Pathogenen benutzt, um die Wirtszelle zu penetrieren, wie bei den Rickettsien (Winkler und Miller, 1980) und für die Zytolyse wie bei *Entamoeba histolytica* (Ravdin et al., 1985). Bei der Invasion der Wirtszelle durch *T. gondii* wird einer – löslichen – Phospholipase A2 eine wichtige Rolle zugesprochen (Saffer und Schwartzman, 1991).

Ein Enzym mit diesen beiden Aktivitäten könnte auch antioxidativ wirken und gleichzeitig Lipidperoxide an Membranen entfernen; nicht zu vergessen auch, dass die Aktivität der Phospholipase A2 zur Erzeugung sekundärer Botenstoffe führt.

Auch in dem verwandten apikomplexen Parasiten *P. falciparum* wurden sowohl zwei 2-Cys Peroxidoxine (Kawazu et al., 2001; Krnajski et al., 2001; Rahlfs und Becker, 2001), von denen eines C-terminal auf –SKL endet (s. Abb. 4.28), sowie ein oder möglicherweise zwei 1-Cys Peroxidoxine beschrieben (Kawazu et al., 2000; Krnajski et al., 2001) die sich kaum unterscheiden, und von denen wiederum eines auf das Tripeptid –SKL endet. Vergleiche mit den in dieser Doktorarbeit gemachten Immunfluoreszenzen mit den *T. gondii* Peroxidoxinen können nicht gemacht werden, da die Enzyme nicht in der Zelle lokalisiert wurden. Allerdings erwiesen sie sich als funktionell, was auch auf eine Funktionalität der *T. gondii* Peroxidoxine schließen lassen dürfte: Funktionalität mit Thioredoxin (wird das *E. coli* Thioredoxin-System verwendet, funktioniert nur das 2-Cys Peroxidoxin, mit dem Plasmodien-eigenen System auch eines der 1-Cys Peroxidoxine) (Kawazu et al., 2001; Krnajski et al., 2001), als Substrat diente Wasserstoffperoxid. GSH als Donor für Reduktionsäquivalente wird von einigen Peroxidoxinen akzeptiert (Kawazu et al., 2000), aber nicht von allen (Kawazu et al., 2001). Diese Parameter sollten bei einer künftigen funktionellen Charakterisierung der beiden Peroxidoxine aus *Toxoplasma gondii* berücksichtigt werden. Eventuell funktionieren die Enzyme jedoch nur mit dem (möglicherweise) vorhandenen endogenen Thioredoxin-System. In *P. falciparum* wird den Peroxidoxinen hauptsächlich eine Rolle bei der Bekämpfung von ROS zugeschrieben (Kawazu et al., 2001; Kawazu et al., 2000), die besonders beim Abbau von Hämoglobin entstehen.

Die Funktionalität und Rolle der Peroxidoxine in *Toxoplasma gondii*, gerade auch im Zusammenspiel mit anderen antioxidativen Enzymen, muss noch gezeigt werden.

6. Zusammenfassung

Im Stamm Apicomplexa, zu dem der obligat intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* gehört, waren bis zum Beginn dieser Doktorarbeit noch keine Peroxisomen beschrieben, ein in fast allen eukaryontischen Zellen vorkommendes Organell. Das Markerprotein von Peroxisomen ist das Enzym Katalase, welches Wasserstoffperoxid (H_2O_2) detoxifiziert. Nach Vorarbeiten in meiner Diplomarbeit wurden Cosmide zur Verfügung gestellt, die die genomische Sequenz der *Katalase* enthielten. In dieser Doktorarbeit wurde die Sequenz der *T. gondii Katalase* ermittelt, bei der es sich um eine typische Katalase handelt. Darüberhinaus befindet sich am C-Terminus ein sogenanntes PTS1-Signal, welches für den Import in Peroxisomen notwendig ist. Es wurden Antikörper hergestellt, um die Katalase innerhalb der Zelle zu lokalisieren und mögliche Peroxisomen zu identifizieren. Die vier Seren detektierten im *Western Blot* eine distinkte Bande, in der Immunfluoreszenzanalyse (IFA) jedoch unterschiedliche Epitope, die einzige Gemeinsamkeit war eine zytosolische, zellzyklus-abhängige Färbung der Zellen. Eines der Seren detektierte eine apikale Struktur in der IFA, welche ein mögliches Peroxisom darstellte. Durch Doppelimmunfluoreszenzanalyse konnte gezeigt werden, dass es sich um eine noch nicht identifizierte Struktur handelte. In dieser Doktorarbeit durchgeführte Fraktionierungsmethoden sowie Importstudien mit GFP-PTS1 Fusionsproteinen ließen auf eine zytosolische Lokalisation der Katalase schließen.

Durch das Ausschalten des Katalase-Gens konnte gezeigt werden, dass die Katalase in *T. gondii* tatsächlich zyotsolisch ist und zellzyklus-abhängig exprimiert wird. Die Funktionalität der Katalase wurde durch einen Enzym-*assay* überprüft, und die Empfindlichkeit Katalase-defizienter Toxoplasmen gegenüber H_2O_2 getestet. Durch die Infektion von Mäusen wurden Hinweise für Unterschiede in der Virulenz von Wildtyp und Katalase-defizienten Toxoplasmen gewonnen. Diese Ergebnisse lassen, zusammen mit der ungewöhnlichen Lokalisation der *T. gondii* Katalase, auf eine Rolle dieses Enzyms unter oxidativen Stressbedingungen schließen. Peroxisomen konnten bisher nicht identifiziert werden.

Außerdem wurden die Gene zweier weiterer antioxidativer Enzyme aus *T. gondii* kloniert und in der Zelle lokalisiert, um ihre potentielle Rolle im Zusammenspiel mit der Katalase zu ermitteln. Es handelt sich um Proteine aus der Familie der Peroxidoxine, die in der Lage sind, diverse Peroxide zu detoxifizieren. Eventuell ist eines davon auch in der Lage, als Phospholipase A2 zu wirken. Ihre funktionelle Charakterisierung sowie die Identifizierung weiterer Komponenten des antioxidativen Systems in *T. gondii* sollten wertvolle Hinweise über das Zusammenspiel zwischen Wirt und Parasit liefern.

7. Abkürzungen und Definitionen

α	anti
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder (<i>bovine</i>)-Serum-Albumin
C	Cytosin
ca.	circa
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CIP	Kälberdarm-Phosphatase (<i>calf intestine phosphatase</i>)
CoA	Coenzym A
CSPD	25 mM Dinatrium 3-4(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dekan]-4-yl)phenylphosphat
ΔA	Absorptionsdifferenz
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
Dic	<i>Differential interference contrast</i>
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
ϵ	Extinktionskoeffizient
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>acid</i>)
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälberserum (<i>calf</i>)
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G	Guanin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
°C	Grad Celsius
GSH	Glutathion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure

HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i> , Wirtszellen
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IEP	Isoelektrischer Punkt
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IgG	Immunglobulin G
J	Joule
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli
M	molar (mol/l)
mAK	monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
min	Minute
MOPS	3-[N-morpholino]-propansulfonsäure
MPA	<i>Mycophenolic acid</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pBS	Plasmid <i>Bluescript</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Wasserstoffstärke (<i>potentia hydrogenii</i>)
PTS	<i>Peroxisomal Targeting Signal</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>acid</i>)
RNase A	Ribonuklease A
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natrium (<i>sodium</i>)-dodecylsulfat
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
SSC	Natrium (<i>sodium</i>)-chlorid/Natrium (<i>sodium</i>)-citrat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THB	Toxoplasmen-Homogenisierungspuffer (<i>buffer</i>)

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
U	Enzymeinheit (<i>Units</i>) oder nur Einheit
ü. N.	über Nacht
UTR	nicht translatierte Region (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
μ	mikro

Verwendete englische Fachausdrücke

<i>alignment</i>	Sequenzvergleich
<i>antisense</i>	nichtkodierend
<i>blocking</i>	Absättigung unspezifischer Bindungsstellen
<i>blotting</i> bzw. <i>Blot</i>	Transfer von DNA, RNA oder Protein auf Membranen
<i>boost</i>	Wiederholte Immunisierung mit dem selben Antigen
<i>core</i>	Kern
<i>downstream</i>	stromabwärts
EST (<i>expressed sequence tag</i>)	kurze Sequenzierung von cDNA exprimierter Gene
<i>glass beads</i>	Glaskügelchen zum mechanischen Aufbruch von Zellen
<i>insert</i>	DNA-Fragment, das in einen Vektor kloniert wurde
<i>kit</i>	Baukasten, enthält die für eine Reaktion notwendigen Reagenzien
<i>knock out</i> (k.o.)	Deletion eines Gens
<i>labelling</i>	Markierung
<i>pellet</i>	Sediment; Niederschlag; Präzipitat
<i>primer</i>	Oligonukleotid
<i>primer walking</i>	Sequenzieren eines Gens mit Hilfe aufeinanderfolgender <i>primer</i>
<i>sense</i>	kodierend
<i>sticky end</i>	3'- bzw. 5'-überhängendes Ende einer dsDNA
<i>strippen</i>	Entfernen von DNA, RNA oder Protein von Membranen
<i>suicide</i> Substrat	Substrat, welches ein Enzym irreversibel hemmt
<i>template</i>	Matrize; Vorlage
<i>upstream</i>	stromaufwärts

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

8. Literatur

- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Autheman, J. M., Fortier, B., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 47, 223-33.
- Aebi, H., Wyss, S. R., Scherz, B., and Skvaril, F. (1974). Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur J Biochem* 48, 137-45.
- Ajioka, J. W., Boothroyd, J. C., Brunk, B. P., Hehl, A., Hillier, L., Manger, I. D., Marra, M., Overton, G. C., Roos, D. S., Wan, K. L., Waterston, R., and Sibley, L. D. (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res* 8, 18-28.
- Alphey, M. S., Bond, C. S., Tetaud, E., Fairlamb, A. H., and Hunter, W. N. (2000). The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol* 300, 903-16.
- Bakker, B. M., Mensonides, F. I., Teusink, B., van Hoek, P., Michels, P. A., and Westerhoff, H. V. (2000). Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2087-92.
- Barr, S. D., and Gedamu, L. (2001). Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidoxin genes from *Leishmania chagasi*: Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals. *J Biol Chem* 3, 3.
- Bastin, P., Bagherzadeh, Z., Matthews, K. R., and Gull, K. (1996). A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 235-239.
- Batra, S., Chatterjee, R. K., and Srivastava, V. M. (1992). Antioxidant system of *Litomosoides carinii* and *Setaria cervi*: effect of a macrofilaricidal agent. *Vet Parasitol* 43, 93-103.
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O. Z., Wattiaux, R., Jacques, P., and De Duve, C. (1964). Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochem J* 92, 179-84.
- Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O., and Joiner, K. A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* 127, 947-61.
- Bergdoll, M., Remy, M. H., Cagnon, C., Masson, J. M., and Dumas, P. (1997). Proline-dependent oligomerization with arm exchange. *Structure* 5, 391-401.

- Beyer, W. F., Jr., and Fridovich, I. (1985). Pseudocatalase from *Lactobacillus plantarum*: evidence for a homopentameric structure containing two atoms of manganese per subunit. *Biochemistry* 24, 6460-7.
- Black, M., Seeber, F., Soldati, D., Kim, K., and Boothroyd, J. C. (1995). Restriction enzyme-mediated integration elevates transformation frequency and enables cotransfection of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 74, 55-63.
- Black, M. W., and Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 607-23.
- Blattner, J., Swinkels, B., Dorsam, H., Prospero, T., Subramani, S., and Clayton, C. (1992). Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. *J Cell Biol* 119, 1129-36.
- Brown, M. R., Miller, F. J., Jr., Li, W. G., Ellingson, A. N., Mozena, J. D., Chatterjee, P., Engelhardt, J. F., Zwacka, R. M., Oberley, L. W., Fang, X., Spector, A. A., and Weintraub, N. L. (1999). Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 85, 524-33.
- Brul, S., Wiemer, E. A., Westerveld, A., Strijland, A., Wanders, R. J., Schram, A. W., Heymans, H. S., Schutgens, R. B., Van den Bosch, H., and Tager, J. M. (1988). Kinetics of the assembly of peroxisomes after fusion of complementary cell lines from patients with the cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome and related disorders. *Biochem Biophys Res Commun* 152, 1083-9.
- Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407, 211-5.
- Carruthers, V. B., and Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 73, 114-23.
- Chen, J. W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., and Fisher, A. B. (2000). 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem* 275, 28421-7.
- Clerch, L. B., Wright, A., and Massaro, D. (1996). Dinucleotide-binding site of bovine liver catalase mimics a catalase mRNA-binding protein domain. *Am J Physiol* 270, L790-4.
- Cornelissen, A. W., Overdulve, J. P., and van, d. P. M. (1984). Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology*.
- Dammai, V., and Subramani, S. (2001). The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105, 187-96.

- De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 46, 323-357.
- DeLuca, D. C., Dennis, R., and Smith, W. G. (1995). Inactivation of an animal and a fungal catalase by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 320, 129-34.
- Desmonts, G., and Couvreur, J. (1974). Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med* 290, 1110-6.
- Didion, T., and Roggenkamp, R. (1992). Targeting signal of the peroxisomal catalase in the methylophilic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett* 303, 113-6.
- Donald, R. G., Carter, D., Ullman, B., and Roos, D. S. (1996). Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J Biol Chem* 271, 14010-9.
- Donald, R. G., and Roos, D. S. (1994). Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase locus in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 63, 243-53.
- Donald, R. G., and Roos, D. S. (1995). Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5749-53.
- Donald, R. G., and Roos, D. S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11703-7.
- Dubey, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 28, 1019-24.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., and Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11, 267-99.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970). Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 56, 447-56.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970). *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc* 157, 1767-70.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132, 636-62.
- Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., and Joiner, K. A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res* 79, 402-8.
- Dubremetz, J. F., and Torpier, G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *J Ultrastruct Res* 62, 94-109.

- Durner, J., and Klessig, D. F. (1996). Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J Biol Chem* 271, 28492-501.
- Eckelt, V. H., Liebau, E., Walter, R. D., and Henkle-Duhrsen, K. (1998). Primary sequence and activity analyses of a catalase from *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol* 95, 203-14.
- Elgersma, Y., Elgersma-Hooisma, M., Wenzel, T., McCaffery, J. M., Farquhar, M. G., and Subramani, S. (1998). A mobile PTS2 receptor for peroxisomal protein import in *Pichia pastoris*. *J Cell Biol* 140, 807-20.
- Endo, T., Sethi, K. K., and Piekarski, G. (1982). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp Parasitol* 53, 179-88.
- Fahimi, D., and Baumgart, E. (1999). Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes: a review. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 47, 1219-1232.
- Feuers, R. J., Pattillo, F. M., Osborn, C. K., Adams, K. L., DeLuca, D., and Smith, W. G. (1993). Application of an integrated rate equation to the inactivation of catalase. *Free Radic Biol Med* 15, 223-6.
- Fichera, M. E., and Roos, D. S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407-9.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10, 248-53.
- Fita, I., and Rossmann, M. G. (1985). The active center of catalase. *J Mol Biol* 185, 21-37.
- Fita, I., and Rossmann, M. G. (1985). The NADPH binding site on beef liver catalase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1604-8.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., and co-authors), e. a. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* 269, 496-512.
- Flores, B. M., Batzer, M. A., Stein, M. A., Petersen, C., Diedrich, D. L., and Torian, B. E. (1993). Structural analysis and demonstration of the 29 kDa antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica* as the major accessible free thiol- containing surface protein. *Mol Microbiol* 7, 755-63.
- Fraaije, M. W., Roubroeks, H. P., Hagen, W. R., and Van Berkel, W. J. (1996). Purification and characterization of an intracellular catalase- peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur J Biochem* 235, 192-8.
- Frenkel, J. K. (1970). Pursuing toxoplasma. *J Infect Dis* 122, 553-9.
- Frenkel, J. K., Dubey, J. P., and Miller, N. L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167, 893-6.

- Frixione, E., Mondragon, R., and Meza, I. (1996). Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 34, 152-63.
- Garcia, M. X., Foote, C., van Es, S., Devreotes, P. N., Alexander, S., and Alexander, H. (2000). Differential developmental expression and cell type specificity of *Dictyostelium* catalases and their response to oxidative stress and UV- light. *Biochim Biophys Acta* 1492, 295-310.
- Geisbrecht, B. V., and Gould, S. J. (1999). The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)- dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 274, 30527-33.
- Gomez Marin, J. E., Bonhomme, A., Guenounou, M., and Pinon, J. M. (1996). Role of interferon-gamma against invasion by *Toxoplasma gondii* in a human monocytic cell line (THP1): involvement of the parasite's secretory phospholipase A2. *Cell Immunol* 169, 218-25.
- Gouet, P., Jouve, H. M., and Dideberg, O. (1995). Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH. *J Mol Biol* 249, 933-54.
- Gould, S. G., Keller, G. A., and Subramani, S. (1987). Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J Cell Biol* 105, 2923-31.
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J., and Subramani, S. (1989). A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108, 1657-64.
- Guan, L., and Scandalios, J. G. (1996). Molecular evolution of maize catalases and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic catalases. *J Mol Evol* 42, 570-9.
- Hannaert, V., and Michels, P. A. (1994). Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J Bioenerg Biomembr* 26, 205-12.
- Hausler, T., Stierhof, Y. D., Wirtz, E., and Clayton, C. (1996). Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin. *J Cell Biol* 132, 311-24.
- Havir, E. A., and McHale, N. A. (1990). Purification and characterization of an isozyme of catalase with enhanced-peroxidatic activity from leaves of *Nicotiana glauca*. *Arch Biochem Biophys* 283, 491-5.
- Hecht, D., and Zick, Y. (1992). Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 188, 773-9.
- Henkle-Duhrsen, K., and Kampkotter, A. (2001). Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* 114, 129-42.
- Hettmann, C. (2000). Identifizierung eines chromatinmodifizierenden Faktors in *Toxoplasma gondii* und Myosine als molekulare Motoren für die Invasion der Wirtszelle durch Apicomplexa. Doktorarbeit, 103.

- Hettmann, C., Herm, A., Geiter, A., Frank, B., Schwarz, E., Soldati, T., and Soldati, D. (2000). A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. *Mol Biol Cell* *11*, 1385-400.
- Hillar, A., Nicholls, P., Switala, J., and Loewen, P. C. (1994). NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and *Escherichia coli* enzymes. *Biochem J* *300*, 531-9.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H., and Kemler, R. (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* *127*, 1375-80.
- Howe, D. K., and Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* *172*, 1561-6.
- Howe, D. K., Summers, B. C., and Sibley, L. D. (1996). Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* *64*, 5193-8.
- Huber, A. H., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* *90*, 871-82.
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* *320*, 61-7.
- Jacobson, M. D. (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* *21*, 83-6.
- Jedd, G., and Chua, N. H. (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol* *2*, 226-31. [taf/DynaPage.taf?file=/ncb/v2/n4/full/ncb0400_226.html](http://www.nature.com/ncb/v2/n4/full/ncb0400_226.html)
[taf/DynaPage.taf?file=/ncb/v2/n4/abs/ncb0400_226.html](http://www.nature.com/ncb/v2/n4/abs/ncb0400_226.html).
- Jones, T. C., Yeh, S., and Hirsch, J. G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med* *136*, 1157-72.
- Kaasch, A. J., and Joiner, K. A. (2000). Targeting and subcellular localization of *Toxoplasma gondii* catalase. Identification of peroxisomes in an apicomplexan parasite. *J Biol Chem* *275*, 1112-8.
- Kang, S. W., Chae, H. Z., Seo, M. S., Kim, K., Baines, I. C., and Rhee, S. G. (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* *273*, 6297-302.
- Kapetanaki, S., and Varotsis, C. (2001). Fourier transform infrared investigation of non-heme Fe(III) and Fe(II) decomposition of artemisinin and of a simplified trioxane alcohol. *J Med Chem* *44*, 3150-6.

- Kawazu, S., Komaki, K., Tsuji, N., Kawai, S., Ikenoue, N., Hatabu, T., Ishikawa, H., Matsumoto, Y., Himeno, K., and Kano, S. (2001). Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* *116*, 73-9.
- Kawazu, S., Tsuji, N., Hatabu, T., Kawai, S., Matsumoto, Y., and Kano, S. (2000). Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* *109*, 165-9.
- Kim, I. H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1989). Induction of an antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O₂, Fe³⁺, or 2-mercaptoethanol. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 6018-22.
- Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1988). The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem* *263*, 4704-11.
- Kim, K., Soldati, D., and Boothroyd, J. C. (1993). Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* *262*, 911-4.
- King, C. A. (1988). Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitol. Today* *4*, 315-319.
- Kitlar, T., Doring, F., Diedrich, D. F., Frank, R., Wallmeier, H., Kinne, R. K., and Deutscher, J. (1994). Interaction of phlorizin, a potent inhibitor of the Na⁺/D-glucose cotransporter, with the NADPH-binding site of mammalian catalases. *Protein Sci* *3*, 696-700.
- Klotz, M. G., Klassen, G. R., and Loewen, P. C. (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol Biol Evol* *14*, 951-8.
- Knoll, L. J., and Boothroyd, J. C. (1998). Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Mol Cell Biol* *18*, 807-14.
- Knott, T. G., Birdsey, G. M., Sinclair, K. E., Gallagher, I. M., Purdue, P. E., and Danpure, C. J. (2000). The peroxisomal targeting sequence type 1 receptor, Pex5p, and the peroxisomal import efficiency of alanine:glyoxylate aminotransferase. *Biochem J* *352 Pt 2*, 409-18.
- Kohler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., and Roos, D. S. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites [see comments]. *Science* *275*, 1485-9.
- Kono, Y., and Fridovich, I. (1983). Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. *J Biol Chem* *258*, 6015-9.
- Krnajski, Z., Gilberger, T. W., Walter, R. D., and Muller, S. (2001). The malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses a functional thioredoxin system. *Mol Biochem Parasitol* *112*, 219-28.

- Krnajski, Z., Walter, R. D., and Muller, S. (2001). Isolation and functional analysis of two thioredoxin peroxidases (peroxiredoxins) from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 113, 303-8.
- Kwon, S. J., Park, J. W., and Kim, K. (1994). Inhibition of metal-catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thiol. *Biochem Mol Biol Int* 32, 419-27.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lazarow, P. B., and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489-530.
- Lee, J., Romeo, A., and Kosman, D. J. (1996). Transcriptional remodeling and G1 arrest in dioxygen stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 24885-93.
- Lee, K. O., Jang, H. H., Jung, B. G., Chi, Y. H., Lee, J. Y., Choi, Y. O., Lee, J. R., Lim, C. O., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2000). Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. *FEBS Lett* 486, 103-6.
- Lee, M. S., Mullen, R. T., and Trelease, R. N. (1997). Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *Plant Cell* 9, 185-97.
- Leriche, M. A., and Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 45, 249-59.
- Leriche, M. A., and Dubremetz, J. F. (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol Res* 76, 559-62.
- Leroy, C., Mann, C., and Marsolier, M. C. (2001). Silent repair accounts for cell cycle specificity in the signaling of oxidative DNA lesions. *Embo J* 20, 2896-906.
- Levine, N. D. (1987). The number of species of rodent coccidia and of other protozoa. *J Protozool* 34, 362-3.
- Levy, E., Eyal, Z., and Hochman, A. (1992). Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Arch Biochem Biophys* 296, 321-7.
- Lim, Y. S., Cha, M. K., Kim, H. K., Uhm, T. B., Park, J. W., Kim, K., and Kim, I. H. (1993). Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 273-80.
- Lingelbach, K., and Joiner, K. A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111, 1467-75.

- Luft, B. J., and Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* *15*, 211-22.
- Mannaerts, G. P., and Van Veldhoven, P. P. (1996). Functions and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.* *804*, 99-115.
- Mayfield, J. E., and Duvall, M. R. (1996). Anomalous phylogenies based on bacterial catalase gene sequences. *J Mol Evol* *42*, 469-71.
- McGonigle, S., Curley, G. P., and Dalton, J. P. (1997). Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitology* *115*, 101-4.
- McGonigle, S., Curley, G. P., and Dalton, J. P. (1998). Peroxiredoxins: a new antioxidant family. *Parasitol Today* *14*, 139-145.
- McNew, J. A., and Goodman, J. M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol* *127*, 1245-57.
- Melik-Adamyany, W. R., Barynin, V. V., Vagin, A. A., Borisov, V. V., Vainshtein, B. K., Fita, I., Murthy, M. R., and Rossmann, M. G. (1986). Comparison of beef liver and *Penicillium vitale* catalases. *J Mol Biol* *188*, 63-72.
- Middelkoop, E., Wiemer, E. A., Schoenmaker, D. E., Strijland, A., and Tager, J. M. (1993). Topology of catalase assembly in human skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* *1220*, 15-20.
- Morrisette, N. S., and Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* *66*, 21-38.
- Moser, H. W., Bergin, A., and Cornblath, D. (1991). Peroxisomal disorders. *Biochem Cell Biol* *69*, 463-74.
- Mullen, R. T., Lee, M. S., Flynn, C. R., and Trelease, R. N. (1997). Diverse amino acid residues function within the type 1 peroxisomal targeting signal. Implications for the role of accessory residues upstream of the type 1 peroxisomal targeting signal. *Plant Physiol* *115*, 881-9.
- Mullen, R. T., Lee, M. S., and Trelease, R. N. (1997). Identification of the peroxisomal targeting signal for cottonseed catalase. *Plant J* *12*, 313-22.
- Murray, H. W., and Cohn, Z. A. (1979). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. *J Exp Med* *150*, 938-49.
- Murray, H. W., Juangbhanich, C. W., Nathan, C. F., and Cohn, Z. A. (1979). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *J Exp Med* *150*, 950-64.
- Murray, H. W., Rubin, B. Y., Carriero, S. M., Harris, A. M., and Jaffee, E. A. (1985). Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* *134*, 1982-8.

- Ngo, H. M., Hoppe, H. C., and Joiner, K. A. (2000). Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends Cell Biol* 10, 67-72. _00001698_00001698.
- Ni, W. T., and Trelease, R. N. (1991). Two genes encode the two subunits of cottonseed catalase. *Arch Biochem Biophys* 289, 237-43.
- Nichols, B. A., and Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool* 34, 217-26.
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L., and Pavesio, C. E. (1994). Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 80, 91-8.
- Nicolle, C., and Manceaux, L. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci[III]* 146, 207-209.
- Nischik, N., Schade, B., Dytnerska, K., Dlugonska, H., Reichmann, G., and Fischer, H. G. (2001). Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes Infect* 3, 689-99.
- Odberg-Ferragut, C., Soete, M., Engels, A., Samyn, B., Loyens, A., Van Beeumen, J., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1996). Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol Biochem Parasitol* 82, 237-44.
- Odenbreit, S., Wieland, B., and Haas, R. (1996). Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol* 178, 6960-7.
- Ogino, N., and C. Yonededa (1966). The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. *Arch. Ophthalmol.* 75, 218-227.
- Opperdoes, F. R. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 41, 127-51.
- Opperdoes, F. R., Borst, P., and Spits, H. (1977). Particle-bound enzymes in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 76, 21-8.
- Ossorio, P. N., Dubremetz, J. F., and Joiner, K. A. (1994). A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J Biol Chem* 269, 15350-7.
- Parsons, M., Furuya, T., Pal, S., and Kessler, P. (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol* 115, 19-28.
- Pfefferkorn, E. R., and Pfefferkorn, L. C. (1976). *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp Parasitol* 39, 365-76.

- Porchet-Hennere, E., and Nicolas, G. (1983). Are rhoptries of *Coccidia* really extrusomes? *J Ultrastruct Res* 84, 194-203.
- Purdue, P. E., Castro, S. M., Protopopov, V., and Lazarow, P. B. (1996). Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel C- terminal peroxisomal targeting sequence. *Ann N Y Acad Sci* 804, 775-6.
- Purdue, P. E., and Lazarow, P. B. (2001). Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 701-52.
- Radke, J. R., and 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, 237-47.
- Rahlfs, S., and Becker, K. (2001). Thioredoxin peroxidases of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* 268, 1404-9.
- Ravdin, J. I., Murphy, C. F., Guerrant, R. L., and Long-Krug, S. A. (1985). Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 152, 542-9.
- Reid, T. J., 3rd, Murthy, M. R., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W. D., and Rossmann, M. G. (1981). Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4767-71.
- Reiss, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M., Soete, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J. F., and Soldati, D. (2001). Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Cell Biology* 152, 563-578.
- Rocha, E. R., and Smith, C. J. (1995). Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 177, 3111-9.
- Ross, S. J., Findlay, V. J., Malakasi, P., and Morgan, B. A. (2000). Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Mol Biol Cell* 11, 2631-42.
- Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P., and Sander, C. (1995). Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Science* 4, 521-533.
- Ryning, F. W., and Remington, J. S. (1978). Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. *Infect Immun* 20, 739-43.
- Sacksteder, K. A., Morrell, J. C., Wanders, R. J., Matalon, R., and Gould, S. J. (1999). MCD encodes peroxisomal and cytoplasmic forms of malonyl-CoA decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J Biol Chem* 274, 24461-8.
- Saffer, L. D., and Schwartzman, J. D. (1991). A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J Protozool* 38, 454-60.

- Sanchez-Moreno, M., Lasztity, D., Coppens, I., and Opperdoes, F. R. (1992). Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol Biochem Parasitol* 54, 185-99.
- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11, 173-86.
- Schaap, D., Kuiper, K., and A., V. (2001). Selection and cloning of potential vaccine antigens from a total *Eimeria tenella* sporozoite homogenate, identification of antioxidant enzymes. International Congress on Toxoplasmosis, Freising, 21-25 Mai *Poster 31*.
- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 10, 2247-58.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., and Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 509-13.
- Seeber, F. (1997). Consensus sequence of translational initiation sites from *Toxoplasma gondii* genes. *Parasitol Res* 83, 309-11.
- Seeber, F., and Boothroyd, J. C. (1996). *Escherichia coli* beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene* 169, 39-45.
- Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H., and Rhee, S. G. (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* 275, 20346-54.
- Sever, J. L., Ellenberg, J. H., Ley, A. C., Madden, D. L., Fuccillo, D. A., Tzan, N. R., and Edmonds, D. M. (1988). Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23,000 pregnancies. *Pediatrics* 82, 181-92.
- Sheptovitsky, Y. G., and Brudvig, G. W. (1996). Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry* 35, 16255-63.
- Sibley, L. D., and Boothroyd, J. C. (1992). Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 51, 291-300.
- Sibley, L. D., and Boothroyd, J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82-5.
- Sibley, L. D., and Howe, D. K. (1996). Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 3-15.
- Sibley, L. D., Lawson, R., and Weidner, E. (1986). Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 19, 83-7.

- Sibley, L. D., LeBlanc, A. J., Pfefferkorn, E. R., and Boothroyd, J. C. (1992). Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics* *132*, 1003-15.
- Sibley, L. D., Messina, M., and Niesman, I. R. (1994). Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 5508-12.
- Sibley, L. D., Weidner, E., and Krahenbuhl, J. L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* *315*, 416-9.
- Sinai, A. P., Webster, P., and Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* *110*, 2117-28.
- Skoneczny, M., and Lazarow, P. B. (1998). A novel, non-PTS1, peroxisomal import route dependent on the PTS1 receptor Pex5p. *Mol. Biol. Cell* *9*, 348a.
- Skoneczny, M., and Rytka, J. (2000). Oxygen and haem regulate the synthesis of peroxisomal proteins: catalase A, acyl-CoA oxidase and Pex1p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the regulation of these proteins by oxygen is not mediated by haem. *Biochem J* *350 Pt 1*, 313-9.
- Soldati, D., and Boothroyd, J. C. (1995). A selector of transcription initiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol* *15*, 87-93.
- Soldati, D., and Boothroyd, J. C. (1993). Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* *260*, 349-52.
- Son, E. S., Song, K. J., Shin, J. C., and Nam, H. W. (2001). Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* *39*, 133-41.
- Soong, C. J., Torian, B. E., Abd-Alla, M. D., Jackson, T. F., Gatharim, V., and Ravdin, J. I. (1995). Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29-kilodalton antigen. *Infect Immun* *63*, 472-7.
- Srivastava, S. K., and Ansari, N. H. (1980). The peroxidatic and catalatic activity of catalase in normal and acatalasemic mouse liver. *Biochim Biophys Acta* *633*, 317-22.
- Stacy, R. A., Nordeng, T. W., Culianez-Macia, F. A., and Aalen, R. B. (1999). The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant J* *19*, 1-8.
- Storch, V., and Welsch, U. (1994). *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. Gustav Fischer Verlag *7. Auflage*.
- Striepen, B., He, C. Y., Matrajt, M., Soldati, D., and Roos, D. S. (1998). Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* *92*, 325-38.

- Subramani, S. (1998). Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev* 78, 171-88.
- Sund, H., Weber, K., and Molbert, E. (1967). [Dissociation of beef liver catalase in its subunits]. *Eur J Biochem* 1, 400-10.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A., and Subramani, S. (1991). A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Embo J* 10, 3255-62.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., and Subramani, S. (1992). Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett* 305, 133-6.
- Sztajer, H., Gamain, B., Aumann, K. D., Slomianny, C., Becker, K., Brigelius-Flohe, R., and Flohe, L. (2001). The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *J Biol Chem* 276, 7397-403.
- Tabak, H. F., Braakman, I., and Distel, B. (1999). Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance. *Trends Cell Biol* 9, 447-53.
- Tang, J., Kriz, R. W., Wolfman, N., Shaffer, M., Seehra, J., and Jones, S. S. (1997). A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. *J Biol Chem* 272, 8567-75.
- Taub, J., Lau, J. F., Ma, C., Hahn, J. H., Hoque, R., Rothblatt, J., and Chalfie, M. (1999). A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in *C. elegans* *daf-C* and *clk-1* mutants. *Nature* 399, 162-6.
- Tenant-Flowers, M., Boyle, M. J., Carey, D., Marriott, D. J., Harkness, J. L., Penny, R., and Cooper, D. A. (1991). Sulphadiazine desensitization in patients with AIDS and cerebral toxoplasmosis. *Aids* 5, 311-5.
- Titorenko, V. I., Nicaud, J.-M., Wang, H., Chan, H., and Rachubinski, R. A. (2002). Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Cell biology* 156, 481-494.
- Titorenko, V. I., and Rachubinski, R. A. (1998). The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci* 23, 231-3.
- Titus, D. E., and Becker, W. M. (1985). Investigation of the glyoxysome-peroxisome transition in germinating cucumber cotyledons using double-label immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 101, 1288-99.
- Torian, B. E., Flores, B. M., Stroehrer, V. L., Hagen, F. S., and Stamm, W. E. (1990). cDNA sequence analysis of a 29-kDa cysteine-rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6358-62.
- Trelease, R. N., Xie, W., Lee, M. S., and Mullen, R. T. (1996). Rat liver catalase is sorted to peroxisomes by its C-terminal tripeptide Ala-Asn-Leu, not by the internal Ser-Lys-Leu motif. *Eur J Cell Biol* 71, 248-58.

- Vaidya, A. B., Akella, R., and Suplick, K. (1989). Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Mol Biochem Parasitol* 35, 97-107.
- van den Bosch, H., Schutgens, R. B., Wanders, R. J., and Tager, J. M. (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* 61, 157-97.
- van den Hoff, M. B. B., Moorman, A. F. M., and Lamers, W. H. (1992). Electroporation in intracellular buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Research* 20, 2902.
- van der Klei, I. J., and Veenhuis, M. (1997). Yeast peroxisomes: function and biogenesis of a versatile cell organelle. *Trends Microbiol* 5, 502-9.
- van der Zypen, E., and Piekarski, G. (1967). Endodyogeny in *Toxoplasma gondii*. A morphological analysis. *Z. Parasitenkd.* 29, 15-35.
- van der Zypen, E., and Piekarski, G. (1968). Ultrastructure on endodyogeny in *Toxoplasma gondii*. *Bol. Chil. Parasitol.* 23, 90-94.
- von Ossowski, I., Hausner, G., and Loewen, P. C. (1993). Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *J Mol Evol* 37, 71-6.
- Wallace, G. D., Marshall, L., and Marshall, M. (1972). Cats, rats, and toxoplasmosis on a small Pacific island. *Am J Epidemiol* 95, 475-82.
- Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S., and McFadden, G. I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12352-7.
- Walton, P. A., Hill, P. E., and Subramani, S. (1995). Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell* 6, 675-83.
- Waterham, H. R., and Cregg, J. M. (1997). Peroxisome biogenesis. *Bioessays* 19, 57-66.
- Wiese, A. G., Pacifici, R. E., and Davies, K. J. (1995). Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 318, 231-40.
- Winkler, H. H., and Miller, E. T. (1980). Phospholipase A activity in the hemolysis of sheep and human erythrocytes by *Rickettsia prowazeki*. *Infect Immun* 29, 316-21.
- Wong, S. Y., and Remington, J. S. (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. *Aids* 7, 299-316.
- Xanthoudakis, S., and Curran, T. (1992). Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *Embo J* 11, 653-65.
- Yamamoto, K., Volkl, A., Hashimoto, T., and Fahimi, H. D. (1988). Catalase in guinea pig hepatocytes is localized in cytoplasm, nuclear matrix and peroxisomes. *Eur J Cell Biol* 46, 129-35.

Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74, 139-62.

Zamocky, M., and Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol* 72, 19-66.