

**Kompartimentalisierung des Kohlenhydrat-
Stoffwechsels in *Toxoplasma gondii***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tobias Fleige

aus

Hildesheim

Göttingen, den 18.09.2006

D7

Referent: Prof. Dr. Uwe Groß

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Braus

Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2006

Aufgabe der Naturwissenschaft ist es nicht nur,
die Erfahrung zu erweitern,
sondern in diese Erfahrung eine Ordnung zu bringen.

Nils Bohr

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Uwe Groß danke ich für die Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit, der Möglichkeit immer eine Diskussion führen zu können und jederzeit ein offenes Ohr für Probleme zu haben.

Ferner danke ich Prof. Dr. Gerhard Braus für die Übernahme des Zweitgutachtens, der interessanten, informativen und motivierenden Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Bohne für die Überlassung des interessanten Themas und seiner sehr guten Betreuung. Durch seine immer vorhandene Bereitschaft Ergebnisse und Ideen zu diskutieren, sowie der Möglichkeit auch eigene Ideen zu verwirklichen, wurde eine produktive Arbeitsatmosphäre geschaffen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Andrea und Christine, sowie Karin, Anne, Ahmad, Diana, Pia, Anja und Sylvia für die vielen, oft endlosen aber immer wieder fruchtbaren Diskussionen, die für das Entstehen dieser Arbeit von unschätzbarem Nutzen waren, und für die unvergessliche Zeit die wir miteinander verbracht haben. Weiterhin bedanke ich mich bei Valeska, Johannes, Nicole B., Michaela, Nicole M. und Jonas für die gute Zusammenarbeit. Ohne Euch alle wäre die einmalige und ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre nicht denkbar gewesen.

Ein außerordentliches Dankeschön geht an Nicole und Dirk für die ständige Unterstützung, das gebotene Asyl, sowie die notwendige Ablenkung und Aufmunterung wenn sie von Nöten war.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir das Studium und die Doktorarbeit erst ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2 Medizinische Bedeutung	3
1.3 Genetische Manipulation von <i>T. gondii</i>	4
1.4 Zellbiologie von <i>T. gondii</i>	6
1.5 Metabolismus in <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.6 Ziele dieser Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Medien und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2.1 Medien und deren Zusätze für die Zellkultur	17
2.1.2.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	17
2.1.3 Zelllinien (Wirtszellen, <i>T. gondii</i> Stämme, <i>E. coli</i> Linien)	18
2.1.4 Medien und deren Zusätze für die Zellkultur	18
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.6 Antikörper	19
2.1.7 Filter	19
2.1.8 Enzyme	19
2.1.9 Reaktionssets („Kits“)	20
2.1.10 Molekulargewichtsmarker	20
2.1.11 Oligonukleotide (Primer)	21
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellkultur	25
2.2.1.1 Kultivierung der humanen Vorhaut-Fibroblasten	25
2.2.1.2 Kultivierung und Isolierung von <i>Toxoplasma gondii</i>	25
2.2.1.2.1 Tachyzoiten	25
2.2.1.2.1 Bradyzoiten	25
2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
2.2.1.4 Transfektion von <i>Toxoplasma gondii</i>	27
2.2.1.4.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz	28
2.2.1.5 Klonierung von <i>T. gondii</i>	29

2.2.1.6 Immunfluoreszenztest	30
2.2.1.7 RNA-Isolierung aus <i>Toxoplasma gondii</i>	31
2.2.1.8 cDNA Synthese	31
2.2.1.9 Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus <i>T. gondii</i>	31
2.2.1.10 Mycoplasmen Test	32
2.2.2 Molekularbiologie	32
2.2.2.1 Nukleinsäuren	32
2.2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	32
2.2.2.1.2 Alkoholische Fällung von DNA	33
2.2.2.1.3 Modifikation von DNA	33
2.2.2.1.4 DNA-Analyse	34
2.2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
2.2.2.1.6 Real-Time PCR	37
2.2.2.1.7 Subklonierung von PCR-Fragmenten	39
2.2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i>	40
2.2.2.2 Proteine	41
2.2.2.2.1 Immunisierung von Mäusen	41
2.2.2.2.2 Proteinbestimmung	41
2.2.2.2.3 SDS-Gelelektrophorese	42
2.2.2.2.4 Coomassie Färbung	43
2.2.2.2.5 Western Blot	43
3. Ergebnisse	45
3.1 Identifizierung von Genen des C-Metabolismus in <i>T. gondii</i>	45
3.1.1 Strategie der Datenbank Recherche	45
3.1.2 Auswahl der Enzyme des C-Metabolismus	46
3.1.3 Gene des C-Metabolismus in <i>Toxoplasma gondii</i>	48
3.1.4 Homologieanalyse	51
3.1.5 Verifizierung des Startcodons	55
3.2. Lokalisierung der Isoformen	56
3.2.1 TetRS Expressionssystem	56
3.2.2 Klonierung der „coding sequence“ der Zielgene	58
3.2.3 Sequenzanalyse der amplifizierten Gene	59
3.2.4 <i>In silico</i> -Analysen	60
3.2.5 Transfektion in <i>Toxoplasma gondii</i>	62

3.2.6 Lokalisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung	63
3.2.7 Herstellung von rekombinanten PDH Fragmenten	70
3.2.8 Gewinnung von Antiserum gegen PDH E1 beta und PDH E2	71
3.2.9 Lokalisierung von PDH-Untereinheiten mittels eines Immunfluoreszenztests	71
3.3 Genexpression während der Stadienkonversion	73
3.3.1 Konstruktion eines Bradyzoiten cDNA-Pools	73
3.3.2 Real-time RT-PCR	74
3.4 Herstellung einer konditionalen Gendelektionsmutante	77
3.4.1 Strategie und Auswahl der Zielgene	78
3.4.2 Klonierung der „Targeting-Vektoren“	79
3.4.3 Transfektion und Selektion der Knock-out Parasiten	81
3.4.4 Klonierung und Isolierung der Deletionsmutante	82
3.4.5 Nachweis der homologen Integration	82
3.4.5.1 RT-PCR	82
3.4.5.2 PCR mit flankierenden Primern	83
3.4.6 Charakterisierung der Deletionsmutante	85
3.4.6.1 Wachstumsgeschwindigkeit in Tachyzoiten	87
3.4.6.2 Komplementierung mit externer Succinat Zugabe	88
4. Diskussion	90
4.1 Der C-Metabolismus im Apicoplasten	90
4.1.1 Der PDH-Komplex und seine Einfluss auf den Metabolismus	90
4.1.2 Der C ₃ – Metabolismus im Apicoplasten von <i>T. gondii</i>	94
4.1.3 Metabolismus in Apicoplasten anderer Apicomplexa	97
4.1.4 Der Metabolismus im Apicoplasten als Ziel für die Medikamentenentwicklung ..	99
4.2 Der Zitronensäure-Zyklus	101
4.2.1 Die Enzyme des TCA-Zyklus in <i>Toxoplasma gondii</i>	102
4.2.2 Ungewöhnliche Mitochondrien bei Protozoen	103
4.2.3 Mögliche Acetyl-CoA Quellen	106
4.2.4 TCA-Zyklus oder kein Zyklus	108
5. Zusammenfassung	113
6. Summary	115
6. Literaturverzeichnis	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ultrastruktureller Vergleich von Tachyzoiten und Bradyzoiten.....	7
Abb. 2: Sekundäre Endosymbiose als Ursprung des Apicoplasten.....	9
Abb. 3: Plasmidkarte pTet07Sag4-ACP-cmyc-DHFR/A/II.....	57
Abb. 4: Lokalisierung glykolytische Enzyme.....	65
Abb. 5: Glykolytische Enzyme im Apicoplasten.....	66
Abb. 6: Lokalisierung des PDH-Komplexes.....	67
Abb. 7: Lokalisierung der Enzyme des TCA-Zyklus.....	68
Abb. 8: Lokalisierung cytosolischer Enzyme.....	69
Abb. 9: Lokalisierung mitochondrialer Enzyme.....	70
Abb. 10: Lokalisierung PEP-Translocator.....	70
Abb. 11: Lokalisierung mit rekombinatem Antiserum.....	72
Abb. 12: LightCycler RT-PCR glykolytischer Enzyme.....	74
Abb. 13: LightCycler RT-PCR PDH-Komplex	75
Abb. 14: LightCycler RT-PCR TCA-Zyklus	76
Abb. 15: LightCycler RT-PCR sonstige Enzyme.....	77
Abb. 16: Schematische Darstellung des induzierbaren Systems.....	78
Abb. 17: Schematische Darstellung der homologen Rekombination.....	80
Abb. 18: RT-PCR zur Kontrolle der Expression.....	83
Abb. 19: Schematische Darstellung des KO-Screenings.....	84
Abb. 20: PCR-Screening gDNA.....	85
Abb. 21: RT-PCR zur Kontrolle der Induzierbarkeit.....	86
Abb. 22: IFT zur Kontrolle der Induzierbarkeit.....	87
Abb. 23: KO-Charakterisierung.....	88
Abb. 24: Komplementierung des KO.....	89
Abb. 25: Reaktionsschema des PDH-Komplexes.....	91
Abb. 26: Metabolitfluss im Apicoplasten I.....	92
Abb. 27: Metabolitfluss im Apicoplasten II.....	96
Abb. 28: Stoffwechselwege im Apicoplasten bei Plasmodium.....	99
Abb. 29: Stoffwechselwege im Mitochondrium von Trypanosoma.....	104
Abb. 30: Der TCA-Zyklus im Mitochondrium von Plasmodium.....	106
Abb. 31: Der TCA-Zyklus im Mitochondrium von Toxoplasma.....	112

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Oligonukleotide für die Klonierung in Tati.....	22
Tab. 2: Oligonukleotide für den LightCycler.....	24
Tab. 3: Oligonukleotide für die Konstruktion des KO.....	24
Tab. 4: Sonstige Oligonukleotide.....	24
Tab. 5: Standardbedingungen für eine PCR.....	37
Tab. 6: PCR-Programm im LightCycler.....	38
Tab. 7: Enzyme der Glykolyse.....	46
Tab. 8: <i>Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex</i>	46
Tab. 9: Enzyme des TCA-Zyklus.....	47
Tab. 10: Weitere Enzyme des C-Metabolismus.....	47
Tab. 11: Liste der vorhergesagten glykolytischen Enzyme.....	49
Tab. 12: Liste der vorhergesagten Untereinheiten des PDH-Komplexes.....	49
Tab. 13: Liste der vorhergesagten Enzyme des TCA-Zyklus.....	50
Tab. 14: Liste der vorhergesagten Enzyme.....	50
Tab. 15: Ergebnisse Homologieblast Glykolyse.....	52
Tab. 16: Ergebnisse Homologieblast PDH-Komplex.....	53
Tab. 17: Ergebnisse Homologieblast TCA-Zyklus.....	54
Tab. 18: Ergebnisse Homologieblast Sonstige Enzyme.....	55
Tab. 19: Neue Annotationen.....	55
Tab. 20: Ergebnisse <i>in silico</i> Analysen.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
cm ²	Quadratcentimeter
cp	crossing point
Cy3	Indocarbocynin
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig (englisch: double-stranded)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
et al.	et alii (und andere)
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm
GSH	Glutathion
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HFF	Humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts)
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
LB	Luria-Broth
M	molar
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	millimolar
μM	mikromolar
mRNA	messenger-RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: Polymerase Chain Reaction)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin (10.000 U / 10.000 µg/ml)
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Reaktion mit anschließender PCR
s	Sekunde
s.	siehe
ss	einzelsträngig (englisch: single-stranded)
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
var.	variabel
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Im Jahr 1908 wurde sowohl von Nicolle und Manceaux in Nordafrika als auch von Splendore in Brasilien ein bis dahin unbekannter intrazellulärer Protozoan beschrieben (Nicolle und Manceaux, 1909). Seinen Namen, *Toxoplasma gondii*, erhielt er in Erinnerung an das Wirtstier aus dem er zuerst isoliert wurde, dem nordafrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gondii*, sowie in Anlehnung an seine gebogenen Form (griechisch: toxon = Bogen; plasma = Form).

Phylogenetisch betrachtet gehört *Toxoplasma* zur Gattung der *Apicomplexa*, die sich aus einzelligen, intrazellulär lebenden, teilweise ökonomisch wichtigen human- und tierpathogenen Parasiten zusammensetzt. Zu ihnen zählen neben den verschiedenen Plasmodien Spezies, dem Verursacher der Malaria, noch weitere Humanpathogene wie *Eimeria* und *Cryptosporidium*, sowie die Tierpathogenen *Neospora*, *Theileria* und *Sarcocystis*.

Die Mitglieder dieser phylogenetischen Gattung haben einen charakteristischen, komplexen Lebenszyklus mit unterschiedlichen Differenzierungsstadien sowie Wirtswechseln. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein eines Apicalkomplexes, einem Komplex aus sekretorischen Organellen am apikalen Pol des Parasiten, der aus Mikronemen und Rhoptrien besteht, sowie einem zusätzlichen plastidähnlichem, nicht photosynthetischen Organell dem Apicoplast aus.

Toxoplasma gondii ist ein obligater intrazellulärer Parasit, der durch sein extrem breites Wirtsspektrum, er kann alle warmblütigen Vertebraten – inklusive des Menschen – infizieren, zu dem am weitesten verbreiteten Parasiten der Welt geworden ist.

Während seines Lebenszyklus kann man bei *Toxoplasma gondii* zwischen drei unterschiedlichen Infektionsstadien unterscheiden:

- (i) den sich schnell asexuell vermehrenden Tachyzoiten,
- (ii) den sich langsam asexuell vermehrenden Bradyzoiten
- (iii) und den vom Endwirt, nach einer sexuellen Vermehrung, ausgeschiedenen Sporozoiten.

Diese drei Stadien sind in einem komplexen Lebenszyklus miteinander verbunden. Der komplette Lebenszyklus des Parasiten konnte erst 60 Jahre nach seiner ersten Beschreibung

1970 mit der Entdeckung des Endwirtes, der Hauskatze oder anderen Mitgliedern der Familie *Felidae*, aufgeklärt werden (Lindsay *et al.*, 1991; Frenkel *et al.*, 1970; Dubey *et al.*, 1998). Ausschließlich in ihnen findet der sexuelle Lebenszyklus von *T. gondii* statt.

Das von Frenkel als Tachyzoiten bezeichnete Stadium (griechisch tachos = schnell) beschreibt den sich schnell replizierenden Parasiten. Die Invasion der Wirtszelle ist ein schneller, aktiver Prozess von 8 – 12 Sekunden Dauer, der mit dem apikalen Ende zuerst erfolgt (Dubremetz, 1998; Morisaki *et al.*, 1995). Während der Invasion bildet sich die parasitophore Vakuole (PV) aus, in der der Parasit innerhalb der Wirtszelle repliziert. Diese parasitophore Vakuole besteht zum Großteil aus der Plasmamembran der Wirtszelle die während der Invasion eingestülpt wird (Sibley, 1995), und aus der sämtliche Transmembranproteine entfernt werden (Mordeu *et al.*, 1999). Nur 20% der Vakuole wird vom Parasiten selbst gebildet und durch das Sekretionssystem der Rhoptrien während der Invasion ausgeschüttet. Eine weitere interessante Eigenschaft der parasitophoren Vakuole ist neben dem Fehlen von Wirtszellproteinen ihre Unfähigkeit, mit Vesikeln der Wirtszelle zu fusionieren. Dadurch wird eine Ansäuerung der Vakuole verhindert, die durch Verschmelzung mit Lysosomen ansonsten zum Tod des Parasiten führen würde (Sibley *et al.*, 1985, Joiner *et al.*, 2001).

Innerhalb dieser PV vermehren sich die Tachyzoiten ungeschlechtlich mittels Endodyogenie, bei der sich innerhalb der Mutterzelle zwei Tochterzellen bilden. Die durchschnittliche Generationsdauer beträgt fünf bis neun Stunden. Nach sieben bis acht Teilungen platzt die Wirtszelle auf und die freigesetzten Parasiten können neue Zellen infizieren. Während dieser Phase der Infektion kommt es zur Ausbreitung des Parasiten in viele Organsysteme, vor allem in Lunge, Leber und Lymphknoten (Frenkel, 1988). Durch das Einsetzen der spezifischen Immunantwort wird die weitere Ausbreitung des Parasiten verhindert.

Um der Immunantwort zu entgehen, differenzieren sich die Tachyzoiten zu Bradyzoiten (griechisch brady = langsam) und die parasitophore Vakuole wird zu einer Zystenhülle umgebaut (Dubey *et al.*, 1998). Die Bradyzoiten vermehren sich ebenfalls mittels Endodyogenie, allerdings sehr langsam. Sie stellen die chronische Dauerform des Parasiten dar und kommen vor allem im zentralen Nervensystem, Auge und Muskelgewebe vor. Hier können sie während der kompletten Lebenszeit des Zwischenwirtes bestehen.

Durch den Verzehr von zystenhaltigem Fleisch können die Parasiten auf weitere Zwischen- oder den Endwirt übertragen werden. Im Magen werden die Zysten vom Magensaft aufgelöst und die Bradyzoiten freigesetzt. Diese infizieren dann die Epithelzellen des Darmlumen und

es erfolgt eine Rückdifferenzierung in Tachyzoiten, die sich weiter in dem Organismus ausbreiten können.

Im Endwirt des Parasiten, der Katze, erfolgt nach dem Übergang vom Bradyzoiten zum Tachyzoitenstadium die sexuelle Vermehrung, die mit der Differenzierung der Tachyzoiten zu Gameten beginnt. Zwei Gameten verschmelzen dann zu einer Zygote, um die sich eine Oozystenwand bildet (Freyre *et al.*, 1989). Diese unreifen Oozysten werden dann mit dem Kot ausgeschieden und im Freien erfolgt die Sporulation bei der die infektiösen Oozysten, jeweils zwei Sporozysten mit je 4 Sporozoiten, entstehen. Die Oozysten können über längere Zeit – bei feuchter Umgebung sogar mehrere Jahre – im Freien überleben und neue Wirte infizieren (Ferguson *et al.*, 1989).

1.2 Medizinische Bedeutung

Toxoplasma gondii, der Erreger der Toxoplasmose, ist wegen seines breiten Wirtsspektrum und seiner Fähigkeit nahezu jede warmblütige Zelle infizieren zu können einer der erfolgreichsten Parasiten weltweit. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert ist, wobei es allerdings gravierende lokale Unterschiede gibt (Tenter *et al.*, 2000). In Deutschland korreliert die Durchseuchungsrate mit dem Lebensalter, etwa 20% der 20-jährigen und circa 30% der 30-jährigen sind serologisch positiv (Gross, 1994).

Die Infektion erfolgt meistens über den oralen Weg, infolge der Aufnahme von zystenhaltigem Fleisch. Die im Darmlumen freigesetzten Bradyzoiten wandeln sich in Tachyzoiten um, die durch das Freisetzen von unterschiedlichen Antigenen die zelluläre Immunantwort induzieren. Während der akuten Infektion treten bei immunkompetenten Menschen keine oder nur schwache Symptome auf, wie beispielsweise das Anschwellen der Lymphknoten und leichtes Fieber (Luft und Remington, 1992).

In immunsupprimierten Patienten, wie beispielsweise nach einer Infektion mit HIV, dem medikamentösen Herunterregulieren des Immunsystems infolge einer Organtransplantation oder nach einer Chemotherapie, kann eine Reaktivierung der Toxoplasmose erfolgen, die in den meisten Fällen in einer Enzephalitis endet. Der Ursprung dieser Enzephalitis liegt in Zysten, die sich nach einer akuten Infektion im Gehirn gebildet haben. Nach dem Aufplatzen dieser Zysten können sich die Bradyzoiten wieder in Tachyzoiten differenzieren, die sich bei fehlender Immunantwort ungehindert ausbreiten und so zu einer Lyse von Zellen

verschiedener Organe führen (Luft und Remington, 1992; Ambroise-Thomas und Pelloux, 1993; Luft *et al.*, 1993).

Komplikationen können ebenfalls nach einer Erstinfektion während der Schwangerschaft auftreten, bei der der Parasit die Plazenta überwinden und so in den Blutkreislauf des Fötus gelangen kann. Wird eine Infektion der Mutter nicht erkannt und medikamentös behandelt, steigt das Risiko des ungeborenen Kindes ebenfalls infiziert zu werden mit der Zeit an (Remington und Desmonts, 1990; Ho-Yen *et al.*, 1992).

Je früher in der Entwicklung des Fötus eine Infektion erfolgt, desto schwerer sind die dabei entstehenden Folgen. Am häufigsten tritt eine Encephalitis auf, was folgenreiche Konsequenzen hat, bei 10% kann sie zum Tod bzw. Abort des Kindes führen, bei weiteren 10-20% treten die klassischen Symptome der Toxoplasmose (Rethinochorioiditis / Hydrocephalus / intracraniale Kalzifikation) während der Geburt auf (Tenter *et al.*, 2000; Bowie *et al.*, 1997).

Eine Behandlung der akuten Toxoplasmose erfolgt mit einer Kombinationstherapie von Pyrimethamin und Sulphadiazin (Tenter *et al.*, 2000), allerdings gibt es keine Medikamente gegen die chronische Infektion durch Bradyzoiten.

1.3 Genetische Manipulation von *T. gondii*

Toxoplasma gondii ist ein nützliches Modellsystem für die genetische Manipulation von Apicomplexa. Der Parasit lässt sich einfach in der Zellkultur kultivieren, durch sein haploides Genom ist er empfänglich für genetische Veränderungen und in Hinsicht auf Codon- und Nucleotidhäufigkeit weist er eine große Ähnlichkeit zu anderen Säugetieren auf (Roos *et al.*, 1994; Donald *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu besitzen die *Plasmodien* Spezies ein sehr AT-reiches Genom, die sich inzwischen aber ebenfalls erfolgreich transfizieren lassen (van Dijk *et al.*, 1996), wobei für *Cryptosporidium* noch immer kein System zur Integration von DNA beschrieben wurde.

Eine erfolgreiche transiente Transfektion in *Toxoplasma gondii* wurde von Soldati und Boothroyd erstmals 1993 beschrieben. Dabei erfolgte eine Elektroporation der Parasiten mit einem Vektor, der als Marker das bakterielle Chloramphenicol Transferase Gen (CAT) unter der Kontrolle verschiedener Promotoren trug (Soldati und Boothroyd, 1993; Donald und Roos, 1993). Die Stärke der transienten Expression des Reportergens war von den verwendeten Promotoren abhängig, wobei der Promoter des α -Tubulins TUB1 eine besonders starke Expression vermittelte.

Mit der Entwicklung von Selektionsmarkern konnte auch auf eine stabile Transfektion selektioniert werden. Ein Resistenzmarker gegenüber Pyrimethamin wurde aus der Fusion der Dihydrofolate-Reduktase sowie einer Thymidylate Synthase (DHFR-TS) aus resistenten Plasmodium-Stämmen isoliert, und als zusätzliches Allel in *Toxoplasma* integriert (Donald und Roos, 1993). Als weitere Marker für eine stabile Integration von Plasmidvektoren in das Genom von *T. gondii* wurden Resistenzkassetten zur Selektion mit Chloramphenicol und Phleomycin, sowie das Ausnutzen der natürlich vorkommenden Tryptophan Auxotrophie des Parasiten beschrieben (Kim *et al.*, 1993; Messina *et al.*, 1995; Soldati *et al.*, 1995; Sibley *et al.*, 1994).

Für eine positiv / negativ Selektion kann das Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoriboxyl transferase-Gen (HXGPRT, Donald *et al.*, 1996) benutzt werden, das ein natürlicher Bestandteil des Genoms von *T. gondii* ist. Es erlaubt eine positive Selektion durch Zugabe von Mycophenolsäure und Xanthin, wie auch eine negative Selektion mit 6-Thioxanthin. Für die positive Selektion wurde ein RH „knock-out“ Stamm generiert, in dem das ursprüngliche Gen deletiert ist. Dieser Stamm weist keine Unterschiede im Wachstums-, Differenzierungs- und Infektionsverhalten im Vergleich zum Ausgangstamm auf.

Ein weiterer Selektionsmarker für eine positiv / negativ Selektion ist das UPRT-Gen von *T. gondii*, das die Umwandlung von Uracil in UMP katalysiert. Durch die Zugabe von 5-fluorodeoxyuridine (FDUR) kann gegen das funktionelle Enzym selektiert werden (Donald und Roos, 1995).

Nach der Etablierung von stabilen Selektionsmarkern lassen sich gezielt Gene durch homologe Rekombination ausschalten und sogenannte Deletionsmutanten generieren. Der Erfolg dieser gezielten Integration hängt von der Länge der homologen Bereiche ab, je länger das Fragment desto Erfolg versprechender ist die homologe Rekombination (Donald und Roos, 1993). Auf diese Weise konnte die Funktion diverser Gene aufgeklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur funktionellen Genanalyse besteht in der Anwendung eines induzierbaren Systems, welches auf Elementen des Tetracyclinresistenz-Operons von *Escherichia coli* basiert (Meissner *et al.*, 2001; Poppel *et al.*, 2006). Eine durch Tetracyclin regulierte Expression erlaubt eine konditionelle und reversible Generierung ansonsten lethaler Gendeletionsmutanten.

Weitere Methoden machen sich die für andere Organismen gut etablierten RNA-Techniken zu Nutze. Dabei können für den Organismus essenzielle Gene untersucht werden. Für *Toxoplasma gondii* wurde von Nakaar der erfolgreiche Einsatz von Antisense-RNA zur Herunterregulierung der Transkriptmenge beschrieben (Nakaar *et al.*, 1999; Nakaar *et al.*,

2000). Al-Anouti publizierte 2002 die Etablierung der RNA-Interferenz (RNAi) zur Genregulierung (Al-Anouti und Ananvoranich, 2002). Allerdings sind beide Methoden nicht universell anwendbar.

Inzwischen sind viele bekannte Reportergene für die Lokalisierung von Transgenen etabliert. Der Einsatz von Fusionsproteinen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) führte zur Aufklärung des endogenen Proteintransportes zu den verschiedenen Organellen (Striepen *et al.*, 1998). Des Weiteren lassen sich β -Galaktosidase exprimierenden Parasiten sowohl in Zellkultur als auch im Mausmodell nachweisen und können so für unterschiedliche Experimente genutzt werden (Seeber und Boothroyd, 1996; Dao *et al.*, 2002).

1.4 Zellbiologie von *T. gondii*

Toxoplasma gondii hat sich wegen seiner Fähigkeit, in nahezu jeder kernhaltigen Zelle reproduzieren zu können und der dadurch sehr einfachen Zellkulturbedingungen, zu einem Modellorganismus für das Studium von intrazellulären Parasiten entwickelt. Inzwischen sind eine Vielzahl von klinischen und tierischen Isolaten gesammelt und charakterisiert worden. Obwohl es keine geographischen Grenzen und Wirtsspezifitäten gibt, haben Genotypisierungen gezeigt, dass sich nur eine Populationsstruktur mit drei klonalen Linien (Typ I / II / III) gebildet hat. Die genetischen Unterschiede zwischen den drei Linien sind sehr gering und liegen bei unter 2% der DNA Sequenz (Ajzenberg *et al.*, 2004). Stämme vom Typ I zeichnen sich durch eine hohe Virulenz im Mausmodell aus, mit einer LD₁₀₀ <10 Parasiten. Sie bilden nur selten Zysten und sind häufig mit konnataler Toxoplasmose assoziiert. Zu ihnen gehört unter anderem der Laborstamm RH. Die Hauptverursacher von chronischer Toxoplasmose beim Menschen fallen in den Genotyp II. Im Mausmodell sind sie wesentlich weniger virulent, was durch eine LD₁₀₀ >1000 gekennzeichnet ist, stattdessen bilden sie eine große Anzahl von Zysten. In den Genotyp III fallen fast keine klinischen Isolate. Die in diesem Typ vertretenen Stämme wurden fast ausschließlich aus Tieren isoliert und zeigten im Mausmodell ebenfalls eine sehr geringe Virulenz. Die meisten der bisher isolierten Stämme fallen in eine dieser drei Genotypen (Grigg *et al.*, 2001; Kim und Weiss, 2004).

Die während der akuten Infektion auftretenden Tachyzoiten haben eine leicht gebogene, bananenförmige Form, sind 2 x 6 μm groß mit einem abgerundeten posterioren und einem spitzen apikalen Ende. Neben den für eine eukaryotische Zelle typischen Organellen wie ein einzelnes Mitochondrium, glattes und raues ER, Ribosomen, Golgi-Apparat und Nukleus besitzt *Toxoplasma gondii* noch weitere spezialisierte Kompartimente, wie Konoid,

Rhoptrien, Mikronemen, Dichte Granula, Mikropore, subpellikuläre Mikrotubuli, Amylopektin Granula sowie ein von mehreren Membranen umgebenes plastid-ähnliches Organell den Apicoplasten.

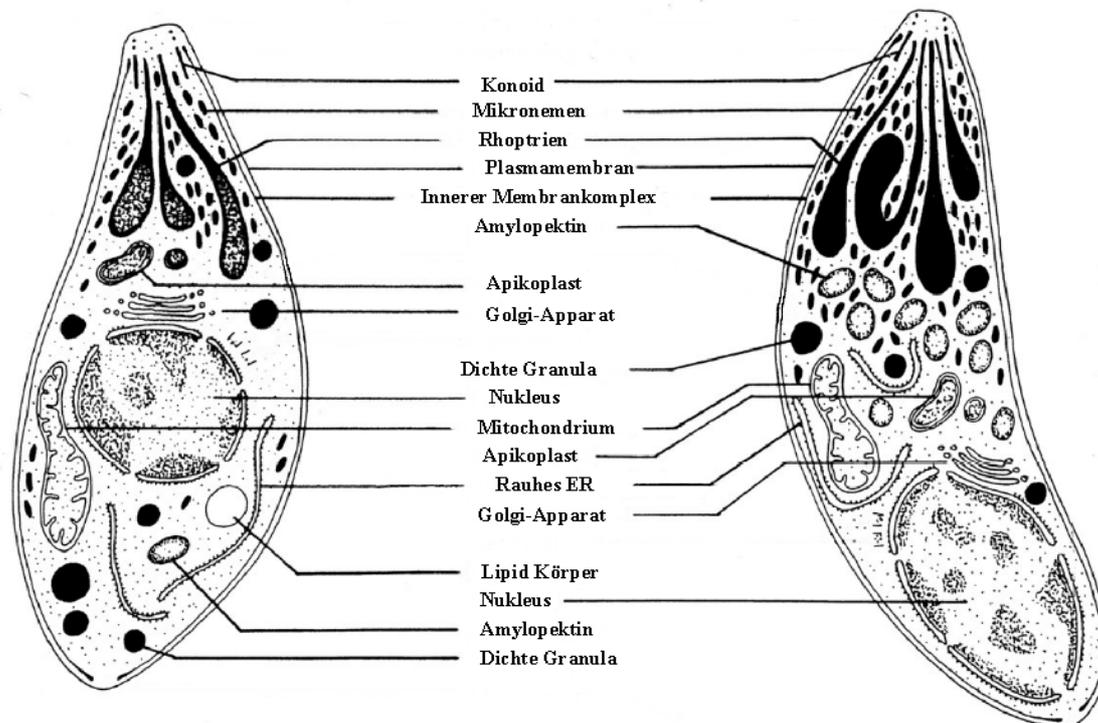


Abb. 1. Ultrastruktureller Vergleich von Tachyzoiten (links) und Bradyzoiten (rechts). Abbildung modifiziert aus Dubey *et al.*, 1998

Der Kern ist nahezu im Zentrum der Zelle lokalisiert. In ihm befindet sich das Genom, welches aus 11 Chromosomen besteht und eine Größe von ~ 80 Mb hat. Inzwischen ist es 10x-fach sequenziert, allerdings noch nicht vollständig annotiert worden. Der Parasit ist von einem Pellikel umgeben, der aus drei Membranen besteht, einer Plasmamembran und zwei dicht aneinander liegenden Membranen, die den inneren Membrankomplex bilden. Die Innere Membran ist am apikalen Ende unterbrochen – oberhalb der polaren Ringe – sowie seitlich an den Mikroporen und am posterioren Ende direkt an der Spitze.

Der Konoid befindet sich am apikalen Ende und besteht aus 6-8 spiralförmig aufgewundenen Tubulinpolymeren. Bei extrazellulären Parasiten ist der Konoid beweglich und kann rotieren, sich neigen, aus- und einfahren, während das Plasmalemma der Wirtszelle auf die passende Eintrittsstelle untersucht wird. Zwischen dem apikalen Ende und dem Zellkern befinden sich 8-10 kegelförmige Organellen, die Rhoptrien. Sie sind sekretorische Strukturen und bestehen aus einem spitzen bis zu $2,5 \mu\text{m}$ langen, in das Innere des Konoid gerichteten Ende, sowie aus einem sackartigen, oft verdrehtem Ende (Hu *et al.*, 2002). Ebenfalls am apikalen Ende

befinden sich weitere sekretorische Elemente, die stäbchenförmigen Mikronemen. Diese apikalen Strukturen sind charakteristisch für die Gattung der Apicomplexa und mit der Wirtszellinvasion, dem Aufbau der parasitophoren Vakuole (PV) sowie dem Aufrechterhalten der dortigen Bedingungen assoziiert. Ein weiteres sekretorisches Organell stellen die Dichten Granula dar.

Ein morphologischer Unterschied zwischen den Tachyzoiten und Bradyzoiten ist das Vorhandensein vieler Amylopektin-haltiger Granula in den Bradyzoiten (Dubey *et al.*, 1998). Neben dem Mitochondrium besitzt *Toxoplasma gondii*, wie fast alle Apicomplexa, noch ein weiteres DNA enthaltendes Organell. Die erste Beschreibung dieses Organells erfolgte 1965 von Scholtyseck und Piekarski, die es bei *Eimeria* entdeckten und als „große Vakuole mit kräftiger Wandung“ bezeichneten (Scholtyseck und Piekarski, 1965). Eine weitere Charakterisierung erfolgte nicht, und so ging dieses Organell als ‚food Vacuole‘ bzw. Mitochondrium in die Literatur ein. Als 1975 neben der genomischen DNA noch ein weiteres DNA-Fragment isoliert werden konnte, das zwar wesentlich größer und länger als die bis dahin bekannten mitochondrialen DNAs war, schien die Funktion dieses Organells geklärt. Erst 1984, als ein weiteres 6 kb großes und 13 μm langes DNA-Fragment gefunden wurde, auf dem sowohl die *Cytochrom-c-Oxidase* Untereinheit I als auch das *Cytochrom b* kodiert waren, kamen erste Zweifel auf, ob das zweite DNA Molekül wirklich dem Mitochondrium zugeordnet werden konnte (Wilson und Williamson, 1997). Mit weiteren Analysen erfolgte nicht nur die Größenbestimmung, die die ungewöhnliche Größe von 35 kb bestätigte, nach Sequenzierung wurden zwei Gene identifiziert die für die β und β' Untereinheit einer RNA Polymerase codieren. Die Anordnung dieser und weiter Gene (*ssrRNA* und *lssrRNA*) in einem „inverted repeat“ sowie Homologievergleiche wiesen deutliche Merkmale auf, wie sie auch in Plastiden gefunden werden (Borst *et al.*, 1984; Gardner *et al.*, 1991; Köhler *et al.*, 1997; Gleeson, 2000). Dieses Plastid-ähnliche nicht photosynthetisch aktive Organell wurde folglich als Apicoplast bezeichnet, und inzwischen in fast allen Apicomplexa nachgewiesen. Einige Gattungen haben es allerdings sekundär wieder verloren.

Der Ursprung des Apicoplasten ist trotz intensiver Forschung noch immer umstritten. Phylogenetische Untersuchungen der *Cox2*-Gene (*Cytochrom-c-Oxidase*), sowie der Proteinsequenz von *TufA*, einem Transkriptionsfaktor im Apicoplasten, zeigten eine nahe Verwandtschaft dieser Proteine zu den Plastiden von Grünalgen und Pflanzen, was auf eine Grünalge als zweiten Endosymbionten hinweist. Andererseits deutet die genetische Organisation der ribosomalen Proteine, sowie der Aufbau des Genoms und phylogenetische

Vergleiche der *GAPDH*-Gene eher auf eine Rotalge als Donor des Plastiden hin (Funes *et al.*, 2002; Waller *et al.*, 1998; Waller *et al.*, 2003).

Der Apicoplast ist klein (0,15-1,5 μm), eiförmig und in der Nähe des Kern lokalisiert. Die auf seinem Genom codierten tRNAs sowie die Anwesenheit von ribosomalen Genen lässt den Schluss zu, dass alle Komponenten für die Translation vorhanden sind (Köhler *et al.*, 1997). Die Deletionen im Plastidgenom sowie gewisse Umordnungen im Vergleich zu anderen Plastiden deuten darauf hin, dass seine ursprüngliche Größe ca. 150 kb war (Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass der Apicoplast von *Toxoplasma gondii* von vier Membranen umgeben ist, ein eindeutiges Zeichen für seinen endosymbiontischen Ursprung. Die zwei inneren Membranen stammen wahrscheinlich vom ersten Endosymbionten der Alge ab, während die dritte Membran die Plasmamembran des sekundären Symbionten darstellt. Die äußerste, vierte Membran stellt eine Verbindung zum Endomembransystem der Zelle her. Alle Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Vorfahr der Apicoplasten eine frei lebende Alge entweder gefressen oder phagozytiert und das Plastid behalten hat (s. Abb. 2). Für eine solche sekundäre Endosymbiose gibt es noch weitere Beispiele sowohl bei Protozoen aber auch bei Algen (Roos *et al.*, 1999).

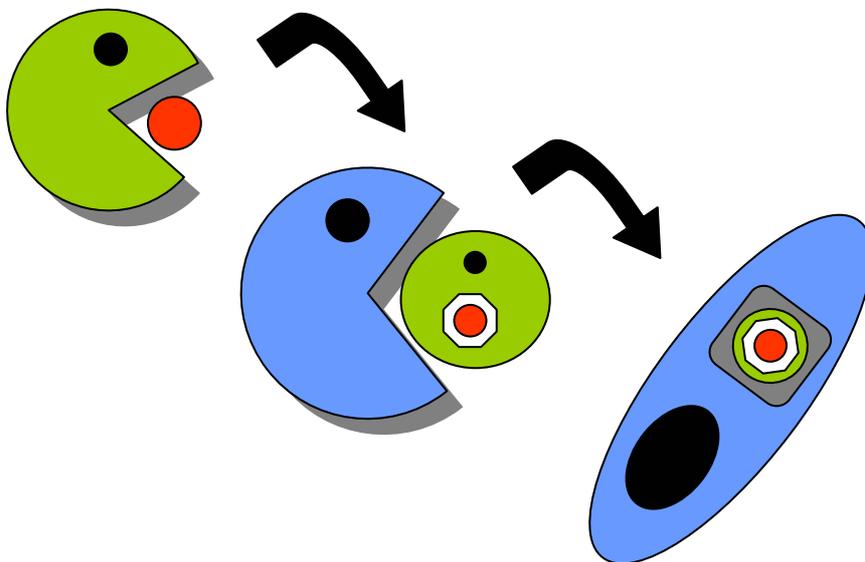


Abb. 2: Sekundäre Endosymbiose als Ursprung des Apicoplasten. Die primäre Endosymbiose eines Cyanobakterium war der Ursprung des Original Plastides, ein Organell das von zwei Membranen umgeben ist. Die Aufnahme dieser Alge von dem Vorfahr der Apicomplexa führte zu dem sekundären Organell mit vier Membranen

Der Apicoplast ist für den Parasiten von essenzieller Bedeutung. Die cyanobakterielle Herkunft des Apicoplasten bedeutet, dass viele seiner Enzyme sich deutlich von denen der Wirtszelle unterscheiden und daher mögliche Ziele für Medikamente sind. Seine Replikation kann gezielt durch Ciprofloxacin inhibiert werden, einem bakteriellen Gyrasehemmer. Der Effekt dieses Medikaments auf *Toxoplasma gondii* wird nicht sofort ersichtlich. Der Parasit ist weiterhin in der Lage innerhalb seiner Wirtszelle zu replizieren, doch nachdem er in eine neue Zelle eingedrungen ist, kann er sich nicht weiter vermehren und stirbt. Er ist scheinbar nicht mehr in der Lage eine funktionierende parasitophore Vakuole aufzubauen oder essenzielle Komponenten für die erfolgreiche Invasion der Wirtszelle bereitzustellen (Fichera und Roos, 1997; Ralph *et al.*, 2004). Dieses Phänomen ist bei vielen Medikamenten, die auf den Apicoplasten wirken, beschrieben worden.

Da das Genom des Apicoplasten sehr reduziert ist, müssen ein Großteil der dort benötigten Enzyme in Kern codiert sein. Durch Genomscreenings konnten bisher mehrere dieser Gene identifiziert werden, darunter die ribosomalen Gene *rps9* und *rpl28*. Während des Transportes dieser Proteine in den Apicoplasten müssen 4 Membranen überwunden werden. In Pflanzen, Grün- und Rotalgen, sowie in Glaucophyten, deren Plastid von zwei Membranen umgeben ist, werden diese Proteine mit einer N-terminalen Signalsequenz markiert und dann zum Apicoplasten transportiert, wo beim Durchqueren der Membranen die Transportsequenz entfernt wird. Die Signalsequenz, auch als Transit-Peptid bezeichnet, ist bei Pflanzen und Algen inzwischen sehr gut charakterisiert worden, allerdings konnte bisher weder eine Konsensussequenz noch eine typische Sekundärstruktur identifiziert werden. Die Transit-Peptide haben eine Länge von 25-125 Aminosäuren (AA), sind basisch und weisen eine Häufung der Aminosäuren Serin und Threonin auf.

Der Transport über vier Membranen hinweg ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Da allerdings die äußere Membran des Plastiden ein Teil des zellulären Endomembransystems der invadierten Zelle ist, erfolgt der gerichtete Transport normalerweise über den sekretorischen Weg in das ER, mit Hilfe eines klassischen Signalpeptides. Diese befinden sich am äußeren N-terminalen Ende, haben eine Länge von 16-34 AA und zeigen die klassischen Eigenschaften, wie eine hydrophobe Domäne, gefolgt von einem „von Heijne“ Spaltungssignal. Im ER angekommen wird das Signalpeptid abgespalten und das dahinter liegende Transit-Peptid wird frei. Dieses Transit-Peptid sorgt dann für den weiteren Transport des Präproteins vom ER über den Golgi-Apparat und das Vesikel-Transportsystem zum Apicoplasten. Dort wird das Signal nach dem Überqueren der Membranen abgespalten und das Protein endgültig prozessiert. Die Kombination von Signalpeptid und Transit-Peptid wird

als „bipartide“ Signalsequenz bezeichnet. Allerdings können solche Sequenzen nicht ausschließlich am N-terminalen Ende vorkommen. Inzwischen wurden auch Proteine beschrieben bei denen dieses Signal innerhalb ihrer Sequenz zu finden ist. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass ein direktes Targeting in den Apicoplasten ohne die Anwesenheit eines bipartiden Signalpeptides möglich ist (Pandini *et al.*, 2002; Gubbels *et al.*, 2004).

1.5 Metabolismus in *Toxoplasma gondii*

Die in Lehrbüchern erläuterte Funktion des Mitochondrium besteht darin, dass es für die Oxidation von Substraten im Zitronensäure-Zyklus verantwortlich ist. Elektronen werden dabei in die Elektronentransportkette in der inneren mitochondrialen Membran eingespeist, die dann Sauerstoff zu Wasser reduzieren. Die dabei freigesetzte Energie wird für den Aufbau eines Protonengradienten genutzt, der eine ATP-Synthase antreibt, die ATP produziert. Dies ist die Hauptenergiequelle der eukaryotischen Zelle.

Der Zitronensäure-Zyklus (TCA-Zyklus) ist normalerweise der zentrale Stoffwechselweg im Mitochondrium, er hat sowohl eine biosynthetische als auch eine katabolische Aufgabe. Seine klassische Funktion, wie es in jedem Lehrbuch beschrieben wird, erfolgt unter aeroben Bedingungen, indem aus Pyruvat – dem Endprodukt der Glykolyse – Acetyl-CoA, ein C₂-Körper, hergestellt wird, der dann in den TCA-Zyklus eingespeist wird. Dort fusioniert Acetyl-CoA mit Oxalacetat und das dabei entstehende Citrat wird dann in mehreren Schritten oxidiert, bei denen CO₂, NADH, FADH₂ und GTP freigesetzt werden und am Ende Oxalacetat wieder regeneriert wird.

Acetyl-CoA kann ebenfalls durch die β -Oxidation von Fettsäuren gebildet werden. Die Oxidation von Aminosäuren liefert weitere Zwischenprodukte des TCA-Zyklus, wie α -Ketoglutarat aus Glutamat; Oxalacetat aus Aspartat; Succinyl-CoA aus Leucin, Valin und Isoleucin. Fumarat und Pyruvat kann aus weiteren Aminosäuren gebildet werden. Mitochondrien von Säugetieren können des Weiteren noch Coenzym Q (Ubichinon), Haem und Eisen-Schwefel-Cluster synthetisieren.

Toxoplasma gondii hat wie fast alle Parasiten des Phylum der Apicomplexa ein einzelnes Mitochondrium, doch das Wissen über seinen Beitrag zum Stoffwechsel des Parasiten ist noch sehr unvollständig. Allerdings scheinen die Apicomplexa unterschiedliche Bedürfnisse an einen TCA-Zyklus zu haben, abhängig von der Spezies und dem Stadium. Während *Cryptosporidia* scheinbar die Gene für seinen TCA-Zyklus verloren hat, konnten sie im Genom von *Plasmodium* identifiziert werden. Die exakte Lokalisation der Proteine und das

Expressionsmuster in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien ist noch nicht endgültig geklärt (Gardner *et al.*, 2002). Mit Hilfe von histochemischen Untersuchungen wurde sowohl eine *Succinat-Dehydrogenase* als auch eine *Isocitrat-Dehydrogenase* identifiziert. Als Besonderheit muss dabei angesehen werden, dass die *Isocitrat-Dehydrogenase* nicht wie im klassischen Zyklus NAD^+ - sondern NADP^+ - abhängig ist. Biochemische Analysen zeigten allerdings nur eine Aktivität im Tachyzoitenstadium und nicht im Dauerstadium der Bradyzoiten. Daraus wurde geschlossen, dass *Toxoplasma gondii* zwar über einen TCA-Zyklus verfügt, dieser aber nur bei den aktiven Tachyzoiten vorhanden ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache dass Atovaquon, ein Medikament zur Behandlung der Toxoplasmose, in der Atmungskette angreift und bei dem Parasiten dazu führt, dass er sich von Tachyzoiten in Bradyzoiten umwandelt. Vercesi *et al.* zeigte 1998 dass mit Hilfe von Digitonin kleine Poren in die Mitochondriummembran eingefügt werden können, ohne die Funktionalität der Mitochondrien zu beeinflussen. Anschließend testete er verschiedene Metabolite auf ihre Fähigkeit die ATP-Produktion zu steigern, um damit ein Bild über die Funktion des TCA-Zyklus zu bekommen. Allerdings führte nur die externe Zugabe von Succinat sowie Malat und nicht von Glutamat, α -Ketoglutarat, Pyruvat, Isocitrat oder Glycerin-3-phosphate zu einer gesteigerten ATP-Produktion. Daraus wurde geschlossen, dass der TCA-Zyklus zwar aktiv ist aber eine andere als die klassische Funktion hat (Vercesi *et al.*, 1998).

Die Hauptenergiequelle des Parasiten in seinen Zwischenwirten scheint die anaerobe Glykolyse zu sein. Zu den glykolytischen Enzymen gehört unter anderem die *Phosphofruktokinase* (PFK), die in vielen Organismen eine wichtige regulatorische Funktion besitzt. In Säugetieren katalysiert sie die Umwandlung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat unter dem Verbrauch von ATP. In Protozoen, wie auch in Pflanzen, wird dabei kein ATP sondern anorganisches Phosphat (PP_i) verbraucht. Dies führt zu einer 50% Steigerung der ATP-Produktion durch die Glykolyse (Peng und Mansour, 1992; Denton *et al.*, 1996). Eine Besonderheit dieses Enzyms ist, dass es keine regulatorische Funktion mehr ausführen kann. Die PP_i -PFK kann nicht allosterisch kontrolliert werden, des Weiteren konnte mit spezifischen Inhibitoren gezeigt werden, dass seine Funktionalität für den Parasiten essenziell ist. Eine Inhibierung des Enzyms war lethal (Denton *et al.*, 1996).

Da weder die PP_i -PFK noch die *Hexokinase* in *Toxoplasma gondii* regulatorisch aktiv sind, kommt der *Pyruvat-Kinase* (PK) eine besondere Funktion zu. Sie katalysiert die irreversible Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und dabei die Phosphorylierung von ADP zu ATP. In *Toxoplasma gondii* wird die *Pyruvat-Kinase* von Glucose-6-phosphat aktiviert,

dazu zeigt sie eine sehr hohe Affinität zu ADP und eine für die Klasse dieser Enzyme sehr hohe Aktivität (Denton *et al.*, 1996; Maeda *et al.*, 2003).

In Tachyzoiten und Bradyzoiten scheint es Unterschiede in der Glykolyse zu geben. Ein Vergleich der Aktivitäten verschiedener Enzyme verriet, dass die Aktivität der *Pyruvat-Kinase* und *Lactat-Dehydrogenase* in Bradyzoiten wesentlich höher als in Tachyzoiten ist (Denton *et al.*, 1996). Ein weiterer Hinweis, dass Tachyzoiten und Bradyzoiten sich im Gebrauch der Glykolyse unterscheiden, erfolgte nach der Identifizierung und Klonierung von stadienspezifischen Isoformen der *Enolase* und *Lactat-Dehydrogenase*. Die beiden in *Toxoplasma gondii* identifizierten *Lactat-Dehydrogenasen* (*LDH1*, *LDH2*) werden jeweils von einem Gen kodiert und weisen auf Ebene der Aminosäuren eine Homologie von 71% auf. *LDH2* war eines der ersten bradyzoitespezifischen Gene die identifiziert werden konnten. In ihrer Enzymaktivität unterscheiden sich die beiden Isoformen kaum (Yang und Parmley, 1995; 1997). Eine Inhibierung der *Lactat-Dehydrogenase* führt zu einer Inhibition des Parasitenwachstums in der Zellkultur (Kavanaghe *et al.*, 2004).

Neben der *Lactat-Dehydrogenase* werden auch β -*Enolase*, das Enzym das die Konversion von 2-Phosphoglycerate zu Phosphoenolpyruvat katalysiert, und *Glucose-6-phosphat-isomerase* (G6-PI), das Enzym für die reversible Umwandlung von Glucose-6-phosphat in Fructose-6-phosphat, unterschiedlich in den beiden Stadien exprimiert. Die *Glucose-6-phosphateisomerase* kann auf mRNA-Ebene in beiden Stadien nachgewiesen werden, allerdings ist ihre Expression im Bradyzoitenstadium 10-fach hoch reguliert. Das korrespondierende Protein dagegen wurde nur in den Bradyzoiten gefunden, was auf eine translationelle Kontrolle der Genexpression schließen lässt (Dzierszinski *et al.*, 1999). Von der β -*Enolase* wurden dagegen zwei Isoformen (*ENO1*, *ENO2*) identifiziert, die vergleichbar zur *Lactat-Dehydrogenase* unterschiedlich exprimiert werden. *ENO1* ist während der Differenzierung 1000-fach hoch reguliert, während *ENO2* fast ausschließlich im Tachyzoitenstadium gefunden wird. Auch diese beiden Proteine werden von jeweils einem Gen kodiert und weisen ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit auf Aminosäureebene auf (74%). Die beiden Enzyme haben unterschiedliche enzymatische Eigenschaften, *ENO2* hat eine dreifach erhöhte spezifische Aktivität bei V_{\max} , dafür ist *ENO1* wesentlich thermostabiler (Dzierszinski *et al.*, 2001).

In ihrer Lokalisierung unterscheiden sich die Isoformen nicht voneinander. Beide *Lactat-Dehydrogenasen* sind im Zytoplasma lokalisiert, während für die *Enolasen* neben der zytosolischen noch eine nukleäre Lokalisierung nachgewiesen werden konnte. Dies deutet

darauf hin, dass die *Enolasen* zusätzlich neben ihrer Funktion als glykolytische Enzyme noch andere Aufgaben während der Entwicklung des Parasiten übernehmen (Ferguson *et al.*, 2002). Die hypothetische Funktion des Apicoplasten basiert auf dem Wissen über den Metabolismus in nicht photosynthetisch aktiven Plastiden von Pflanzen, wie beispielsweise die Fettsäuresynthese, die Biosynthese von Isoprenoiden, Haem, Stärke und aromatischen Aminosäuren (Bisanz *et al.*, 2006). Mit Hilfe von *in silico* Analysen, bei denen nach den typischen Signalsequenzen für den Apicoplastimport gesucht wurde, konnte die Anwesenheit von einiger dieser Biosynthesewege vorausgesagt werden.

Experimentell wurde die Lokalisation und Funktionalität nahezu sämtlicher Enzyme für die Fettsäuresynthese im Apicoplasten nachgewiesen. Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Arten der Fettsäuresynthese, Typ I und Typ II. Typ I kommt im Cytosol von Tieren und Pilzen vor, während Typ II bei vielen Prokaryoten und in den Plastiden von eukaryotischen Zellen bei Pflanzen und Algen gefunden wird. Sowohl *Toxoplasma gondii* als auch *Plasmodium* ssp. hat ausschließlich Gene für die Typ II Fettsäuresynthese.

Des Weiteren wurde eine *Ferredoxin NADP Reduktase* (FNR), die vergleichbar zu ähnlichen Isoformen in nicht photosynthetisch aktiven Plastiden ist, isoliert und charakterisiert. Dieses Enzym überträgt Elektronen von NADPH zum Ferredoxin. Weitere im Apicoplasten bestätigte Stoffwechselwege sind die Mevalonate unabhängige Isoprenoidesynthese, sowie Synthesewege für Eisen-Schwefel-Cluster, Liponsäuren und Teile der Häm-Biosynthese (Waller *et al.*, 1998; Jelenska *et al.*, 2001; Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001; Thomson-Zieger *et al.*, 2004; Ralph *et al.*, 2004).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Eine reaktivierte Toxoplasmose stellt die häufigste opportunistische Infektion des zentralen Nervensystems in AIDS-Patienten dar. Die chronische Infektion ist verbunden mit einer Differenzierung des Parasiten in das Bradyzoitenstadium und einer Zystenbildung, wodurch *T. gondii* bis zum Ableben seines Wirtes überdauern kann. Bisher ist keine Behandlung in der Lage, das Zystenstadium erfolgreich zu eliminieren, so dass die Gefahr einer Reaktivierung ständig bestehen bleibt.

Der Kohlenstoffmetabolismus des Parasiten ist bisher nur ansatzweise aufgeklärt und das Zusammenspiel der einzelnen Organellen nur teilweise verstanden worden. Besonders die Anwesenheit des Apicoplasten und sein Einfluss auf den Metabolismus kann zu der Entdeckung neuer wirksamer Angriffspunkte für die Entwicklung von Medikamenten führen.

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, ob Toxoplasma überhaupt über einen funktionierenden Zitronensäure-Zyklus verfügt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Kohlenstoffmetabolismus des Parasiten näher zu charakterisieren. Dafür sollten die Gene der Glykolyse und des Zitronensäure-Zyklus im Genom identifiziert und die Lokalisierung der Enzyme in den einzelnen Kompartimenten bestimmt werden. Durch Disruption von Genen des Zitronensäure-Zyklus sollten Gendeletionsmutanten generiert werden, mit deren Hilfe die Funktion des Zykluses näher charakterisiert werden sollte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschränke	Heraeus, Hanau
ElectroCell Manipulator Typ 600	BTX, Holliston, MA, USA
Fluoreszenzmikroskop	Modell DM R, Leica, Heidelberg
Geldokumentationsanlage	BioDoc II, Biometra, Göttingen
Gelelektrophoresekammern für	
Agarosegele	von Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Hybridisierungsöfen	Modell OV5, Biometra, Göttingen
Konfokales Laserscan Mikroskop	Modell TCS SP2, Leica, Heidelberg
LightCycler	Roche, Basel, Schweiz
Magnetrührer	RCT basic, IKA Labortechnik Staufen
Mikrotiterschüttelplatte	Modell MTS 4, IKA Labortechnik, Staufen
PCR-Thermocycler	Modell T3, Biometra, Göttingen
pH-Meter	Modell 766, Calimatic, Knick, Berlin
Pipetten	Modell Research, Eppendorf, Hamburg
	Modell Reference, Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator	SM-30 Control, Johanna Otto GmbH, Hechingen
Spannungsgeräte	EPS 600, Pharmacia Biotech, Freiburg
	Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Sterilbank	BDK-S 1800, BDK Luft- und Reinraum
	Technik, Sonnenbühl
Thermocycler	Modell T3, Biometra, Göttingen
Thermomixer	Modell Compact, Eppendorf, Hamburg
UV-Crosslinker	UVC-500, Hoefer, San Francisco, CA, USA
UV-Tisch	TFX-20M, Gibco BRL, Eggenstein
Vortexer	Reax Top, Heidolph, Kelheim

Waagen	BP 221 S, Sartorius, Göttingen LP 6200 S, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkulturmikroskop	Modell DM IL, Leica, Heidelberg
Zentrifugen	Megafuge 2.0 RS, Heraeus, Hanau Megafuge 2.0, Heraeus, Hanau Modell 5417 R, Eppendorf, Hamburg Modell 5417 C, Eppendorf, Hamburg RC-26 Plus, Sorvall-Kendro, Hanau

2.1.2 Medien und Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1 Medien und deren Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's MEM (DMEM) Medium mit 580 mg/l L-Glutamin und 3,7 g/ NaHCO₃
DMEM Medium (10x) mit 4,5 g/ l D-Glucose, 8 mg/ l Phenol Rot, ohne NaHCO₃, Na-Pyruvat, L-Glutamin
Penicillin / Streptomycin (Pen-Strep), 10.000 U / 10.000 µg/ ml
Fötales Kälberserum (FCS); inaktiviert durch 45 min Inkubation bei 56° C
EDTA (Versen) 1% in PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺
Trypsin (1:250) 0,25% in PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺
Trypsin-EDTA (1x) in HBSS ohne Ca²⁺, Mg²⁺
HEPES, 1 M
L-Glutamin, 200 mM
NaHCO₃ 7,5% in PBS
PBS (phosphate buffered saline)

Alle Medien und Zusätze wurden von Biochrom, Berlin bezogen

2.1.2.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von folgenden Firmen bezogen:
Nunc, Roskilde, Dänemark; Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg; Corning / Costar, Bodenheim; Greiner, Frickenhausen; Braun, Braun-Melsungen, Melsungen.

2.1.3 Zelllinien (Wirtszellen, *T. gondii* Stämme, *E. coli* Linien)

Wirtszellen	Humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF)
<i>T. gondii</i> -Stämme	RH wt RH Tati (M.Meisner)
<i>E. coli</i> Stämme	TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) DH5 α

2.1.4 Medien und deren Zusätze für die Zellkultur

Lurio Broth (LB)-Medium

- 1 % Bacto-Trypton
- 0,5 % Bacto-Hefeextrakt
- 0,5 % NaCl

LB-Platten (ca. 15 ml/Platte)

- 1 % Bacto-Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 0,5 % NaCl
- 1,5 % Agar
- 50 μ g/ml Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml, sterilfiltriert)

2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Im Laufe dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien wurden, falls im Text nicht anders erwähnt, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Calbiochem (Bad Soden), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden im Allgemeinen, soweit nicht anders vorgegeben mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

2.1.6 Antikörper

Kaninchen-anti-Toxoplasma, Serum (p)

Maus-anti-His-Tag IgG (m); Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Cy2-konjugiertes Esel-anti-Ratte IgG, F(ab')₂-Fragment; Dianova, Hamburg

Cy2-konjugiertes Esel-anti-Maus IgG, F(ab')₂-Fragment; Dianova, Hamburg

Cy3-konjugiertes Esel-anti-Kaninchen IgG, F(ab')₂-Fragment; Dianova, Hamburg

Cy3-konjugiertes Esel-anti-Maus IgG, F(ab')₂-Fragment ; Dianova, Hamburg

(p): polyklonal

(m): monoklonal

Cy2: Carbocyanin

Cy3: Indocarbocyanin

2.1.7 Filter

Falcon Cell Strainer, 70 µm Nylon

Corning Bottle Top Filter, 0,22 µm CA (Cellulose Acetate)

Corning 26 mm Syringe Filter, 0,20 µm Micron Membran, 0,45 µm Micron Membran

2.1.8 Enzyme

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	New England BioLabs (NEB), Schwalbach
DyNazyme EXT DNA-Polymerase	New England BioLabs (NEB), Schwalbach
Quick T4 DNA Ligase	New England BioLabs (NEB), Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs (NEB), Schwalbach
Antarktische Phosphatase	New England BioLabs (NEB), Schwalbach
Deoxyribonuklease I (DNaseI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
M-MLV Reverse Transkriptase RNase	
H Minus, Point Mutant	Promega, Mannheim
Pepsin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.9 Reaktionssets („Kits“)

RNA Isolation

GenElute Mammalian Total

RNA Miniprep Kit Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Plasmid DNA Isolation

GenElute Plasmid Maxiprep Kit Sigma-Aldrich, Deisenhofen

GenElute Plasmid Miniprep Kit Sigma-Aldrich, Deisenhofen

DNA Fällung

QIAquick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden

DNA Isolation aus Agarosegelen

QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen, Hilden

gDNA Isolation

E.Z.N.A. Tissue DNA Mini Kit (C-Line) PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

DNA Klonierungen

Topo TA Cloning Kit Invitrogen, Karlsruhe

QIAGEN PCR Cloning Kit Qiagen, Hilden

2.1.10 Molekulargewichtsmarker

DNA Standard

1 kb DNA Ladder MBI Fermentas, St.Leon-Rot

100 bp DNA Ladder MBI Fermentas, St.Leon-Rot

2.1.11 Oligonukleotide (Primer)

Enzym	Sequenz	Produktlänge	Annealing Temp
GPM1 Afl 1+	5'-tacttaagaaaatgggggccaaggcaagcaggatg-3'	1908 bp	62° C
GPM1 Avr 2-	5'-tacctaggaatgacagttggcgtctcag-3'		
GPM2 Avr 2-	5'-tacctaggtgtgacctggatcgcgggatg-3'	1788 bp	60° C
GPM2 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatgtctgtccgcaaacagaaag-3'		
HK Avr 2-	5'-tacctaggcacatctgcatcagagcagcacc-3'	1401 bp	62° C
HK Nsi 1+	5'-taatgcataaaatgcagcctcgtcaacc-3'		
GPI Avr 2-	5'-tacctaggctcgcactgctgcacgtatgctc-3'	1686 bp	64° C
GPI Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggcgccgacacagct-3'		
PFK2 Afl 1+	5'-tacttaagaaaatgactttcttctctttaaag-3'	1500 bp	60° C
PFK2 Avr 2-	5'-tacctaggcatgcatgcagtcaccttg-3'		
Ald1 Avr 2-	5'-tacctaggcacgtagcgtttctcgaagagggg-3'	1080 bp	61° C
Ald1 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatgtcgggatcagctct-3'		
TPI1 Avr 2-	5'-tacctagggttcttctcatgccagaggcaat-3'	756 bp	64° C
TPI1 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggcgccaccccgtg-3'		
TPI2 Avr 2-	5'-tacctagggtgctgctcgtcatcaatgat-3'	1122 bp	64° C
TPI2 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatgtcgggctccgcttc-3'		
GAPDH1 Avr 2-	5'-tacctagggcgcctcctggacggacatgtagt-3'	1017 bp	62° C
GAPDH2 Nsi 3+	5'-taatgcataaaatgggtgcaagctgggtattaac-3'		
PGK1 Afl 1+	5'-tacttaagaaaatgctggcaacaagc-3'	1248bp	58° C
PGK1 Avr 2-	5'-tacctagggttggacagagccgacaccagg-3'		
PGK2 Avr 2-	5'-tacctaggcgtctcttctcgtctgaaagcgc-3'	1653 bp	61° C
PGK2 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggggcttgggctg-3'		
PGM2 Avr 2-	5'-tacctagggccttctcgttggcgacagc-3'	792 bp	56° C
PGM2 Nsi 3+	5'-taatgcataaaatgttctcgttcaactttc-3'		
ENO2 Avr 2-	5'-tacctagggttgggatggcgaagccagc-3'	1332 bp	56° C
ENO2 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggggccatcaaggacaac-3'		
ENO1 Afl 1+	5'-tacttaagaaaatgggttatcaaggacatc-3'	1284 bp	58° C
ENO1 Avr 2-	5'-tacctaggggactcctcaatccgataag-3'		
PK1 Avr 2-	5'-tacctaggcacagtaagaaccttgagaaggtg-3'	1590 bp	56° C
PK1 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggcatcacaacaac-3'		
PK2 Avr 2-	5'-tacctaggctctctaagtgccgtacgtg-3'	1200 bp	60° C
PK2 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggacgatggggagcagag-3'		
PDHE1a Nsi1+	5'-taatgcataaaatggggcctctcgtgctc-3'	1905 bp	58° C
PDHE1a Avr 2-	5'-tacctaggtcaatcacaatcgggtg-3'		
PDHE1b Afl 1+	5'-tacttaagaaaatggcgggtgctcgtatg-3'	1410 bp	62° C
PDHE1b Avr 2-	5'-tacctagggccttctcgtggtcgg-3'		
PDHE3 Afl 1+	5'-tacttaagaaaatgttttgccttgtgctc-3'	1059 bp	56° C
PDHE3 Avr 6-	5'-tacctagggccccgctccaccatcaca-3'		
OGDHE3 Afl 1+	5'-tacttaagaaaatgaaggcagcgggtttt-3'	1557 bp	58° C
OGDHE3 Avr 2-	5'-tacctagggcctcctggtgggctt-3'		
CS1 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatgctcctctcacgccta-3'	1200 bp	58° C
CS1 Avr 2-	5'-tacctagggcactcctggttcgaccaggc-3'		
Aco Nsi 1+	5'-taatgcataaaatgaaggcctcctcaat-3'	1200 bp	62° C
Aco Avr 2-	5'-tacctaggctcgtccacggggaagaac-3'		
IDH1 Afl 1+	5'-tacttaagaaaatggcttccgcttcgc-3'	1200 bp	62° C
IDH1 Avr 2-	5'-tacctaggagcagcctcgttaccagacag-3'		
IDH2 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatgtcaggattccagcga-3'	1257 bp	60° C
IDH2 Avr 2-	5'-tacctagggccttacttatgatctg-3'		

BCOGDHE1 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggcgcacacggcctcc-3'	1389 bp	64° C
BCOGDHE1 Avr 2-	5'-tacctaggcagagactcgtattcctt-3'		
SCSa Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggctgcctgcattctt-3'	999 bp	60° C
SCSa Avr 2-	5'-tacctagggtgaaggccggccgcctg-3'		
SCSb Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggcgctctcagccgct-3'	1494 bp	64° C
SCSb Avr 2-	5'-tacctaggcggcggcgaatgtgaac-3'		
MDH Nsi 3+	5'-taatgcataaaatgttctctccaccgtgtgcctc-3'	1410 bp	62° C
MDH Avr 2-	5'-tacctaggggctgacttggagcagc-3'		
FAD-MDH Avr 2-	5'-tacctaggcggcgggtattcgcttc-3'	1647 bp	64° C
FAD-MDH Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggctgctgcctcggttc-3'		
PEP-CK Afl 1+	5'-tacttaagaaaatgaatagaacacagctcgtcggg-3'	1500 bp	62° C
PEP-CK Avr 2-	5'-tacctagggaaccggaccagcagccacaac-3'		
P-Carboxy Avr 4-	5'-tacctaggaggggcccctgcgatactcc-3'	1794 bp	60° C
P-Carboxy Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggcacctctgactcagccgttc-3'		
G3PDH2 Avr 2-	5'-tacctaggcgaacacgtacccttctc-3'	1200 bp	58° C
G3PDH2 Nsi 1+	5'-taatgcataaaatggaatccttctcgacc-3'		
PEP-Trans Afl 1+	5'-tacttaagaaaatggaggaatcgaacg-3'	1056 bp	60° C
PEP-Trans Avr 2-	5'-tacctaggctcgtacttggtctcgagagagaat-3'		

Tab. 1: Oligonukleotide für die Ampifikation der Fragmente zu Klonierung in pTet-Sag4-cmyc-DHFR

Gen	Sequenz	Produktgröße	Annealing Temp
GPM1 1+	5'-aagctcggcgtccaagtcaacatc-3'	288 bp	59° C
GPM1 2-	5'-cgcgtaagtcaaattcgggtctgg-3'		
GPM2 1+	5'-tggaacgccgatggtcaagaaga-3'	361 bp	62° C
GPM2 2-	5'-tcccggaagagacagcagaacaga-3'		
HK 3+	5'-gtgccgtgttgactcatc-3'	261 bp	58° C
HK 4-	5'-gcacggcgccaaatactc-3'		
GPI 1+	5'-ctcggctgtggcattctctct-3'	262 bp	60° C
GPI 2-	5'-gcgctcccgtgctctccat-3'		
PFK1 3+	5'-gtcggctcatgggaagacaacc-3'	361 bp	60° C
PFK14-	5'-gagtgagcgcctaccccaagac-3'		
PFK2 1+	5'-gggtggctgcgctggtgatgat-3'	363 bp	62° C
PFK2 2-	5'-ccccggagactggcagaataa-3'		
Ald1 3+	5'-gcagcggcgggcaagggtattct-3'	302 bp	62° C
Ald1 4-	5'-gtcgcttctcgtcgtccgtcagc-3'		
Ald2 3+	5'-gacagtatcgggtagaaaacac-3'	294 bp	56° C
Ald2 4-	5'-agcgctgcctcgtagta-3'		
TPI1 3+	5'-accggggagatcagcgtggaatg-3'	353 bp	61° C
TPI1 4-	5'-aactcgggatatgctcgtggact-3'		
TPI2 1+	5'-ctccgcgccagtctctt-3'	391 bp	57° C
TPI2 2-	5'-atagcccatgttcagtgc-3'		
GAPDH1 3+	5'-ggctgtgggcaagattattcct	264 bp	58° C
GAPDH1 4-	5'-atgatccggcgttgatgt-3'		
GAPDH2 1+	5'-ggtggacggccccgagttct-3'	339 bp	62° C
GAPDH2 2-	5'-gccacggcctctccagtcg-3'		
PGK1 3+	5'-gggaggcggccaagggtc-3'	311 bp	57° C
PGK1 4-	5'-tgtcgacgccatccatc-3'		
PGK2 3+	5'-gcgctggccaaggagaagg-3'	328 bp	59° C
PGK2 4-	5'-ctattgccccacagatcacc-3'		
PGM1 1+	5'-cagcgacatgaagcagcagcag-3'	261 bp	60° C
PGM1 2-	5'-gagggggacgcagcagcactgag-3'		

PGM2 1+	5'-cgagccaagcacggagatg-3'	330 bp	60° C
PGM2 2-	5'-ggtacgcctgtggggatgtca-3'		
ENO2 1+	5'-agcggcgcatccactggcatctac-3'	356 bp	60° C
ENO2 2-	5'-aacgggacgggcattaccatcttg-3'		
ENO1 1+	5'-cgaggggtggctgaaaaagtatcc-3'	336 bp	57° C
ENO1 2-	5'-cagcgaagcccacgacaag-3'		
PK1 1+	5'-ggccgccacatccgcattattc-3'	396 bp	60° C
PK1 2-	5'-cgcaggtagtccacgcaggttc-3'		
PK2 1+	5'-accggcgagctgggattatgaaga-3'	319 bp	61° C
PK2 2-	5'-ctgggcaagaacggaaagaa-3'		
PDHE1a 1+	5'-gatgccgtcgtctccacctac-3'	274 bp	59° C
PDHE1a 2-	5'-gcaaacccgccaatcat-3'		
PDHE1b 1+	5'-cgctaggcaggggacggacatcac-3'	396 bp	63° C
PDHE1b 2-	5'-acgagccacagcgcagattcacc-3'		
PDHE2 1+	5'-cgcggaacatggaagcaagg-3'	412 bp	59° C
PDHE2 2-	5'-gccaaccgtagatagccgatgat-3'		
PDHE3 1+	5'-gaactgcgggtctcctgccttc-3'	341 bp	61° C
PDHE3 2-	5'-tgacgggtcgtctttgaactgct-3'		
OGDHE3 1+	5'-gacgccgcccgaatcaca-3'	303 bp	61° C
OGDHE3 2-	5'-gcggaactctcggcggaacctg-3'		
CS1 1+	5'-acgcgctcggcgaataagtc-3'	270 bp	58° C
CS1 2-	5'-gcgggggaataaaaaggagcagaa-3'		
CS2 1+	5'-gctgctcggggaccttattc-3'	252 bp	62° C
CS2 2-	5'-aggccttgacgagcactggatgag-3'		
CS3 1+	5'-ccagggcggcgtccaggtc-3'	457 bp	61° C
CS3 2-	5'-gcgccctcgtcgtctcc-3'		
Aco 1+	5'-cgaacatggcgcccgaatacg-3'	477 bp	62° C
Aco 2-	5'-cgccgcgcccagaaatcacg-3'		
IDH1 1+	5'-cgcgctccgatttgatt-3'	485 bp	56° C
IDH1 2-	5'-agccacctcggacttga-3'		
IDH2 1+	5'-ggtcgcccaagcaatcaaaag-3'	350 bp	59° C
IDH2 2-	5'-aagcctgcctctacggctctaca-3'		
OGDHE1a 1+	5'-gccgcgcccagcttacaggt-3'	339 bp	60° C
OGDHE1a 2-	5'-agagcggcgagttgacggttgaa-3'		
BCOGDHE1 1+	5'-gcagcaccctgttcccttctcaa-3'	386 bp	61° C
BCOGDHE1 2-	5'-gccgtctgcagcgtcttccacc-3'		
OGDHE2 1+	5'-gagccgatcgtcagaggattg-3'	392 bp	60° C
OGDHE2 2-	5'-cgccgccgttcgagatggtg-3'		
SCSa 1+	5'-acatggtccgctcaaacagg-3'	311 bp	58° C
SCSa 2-	5'-acgaagcgtccaggcagtc-3'		
SCSb 1+	5'-cggcgggatgctgaacgaa-3'	300 bp	62° C
SCSb 2-	5'-gctcccgatgcccgaagacac-3'		
Fum 1+	5'-cgcaaacatcgccgaggaagag-3'	476 bp	59° C
Fum 2-	5'-gcagaaaggccccaaccacaatc-3'		
MDH 1+	5'-tgcccctccctcattcaccactg-3'	385 bp	58° C
MDH 2-	5'-acgcacggcagcccacataca-3'		
FAD-MDH 1+	5'-ttgcggccgaaatgtgaat-3'	366 bp	61° C
FAD-MDH 2-	5'-tagccctgtcgtatgtgagat-3'		
PEP-CK1 1+	5'-gcgcccagctctccacaacac-3'	292 bp	62° C
PEP-CK1 2-	5'-gccggcaaaagcgtccacaat-3'		

PEP-CK2 1+	5'-cgccggcgcacatcgctact-3'	352 bp	62° C
PEP-CK2 2-	5'-ctcccgtcctcgccgtccac-3'		
P-Carboxy 1+	5'-atccgaggagtcacgacaaacatt-3'	304 bp	62° C
P-Carboxy 2-	5'-ggggcgcctgcgatactgc-3'		
G3PDH1 1+	5'-ctccggagccaatgtagccaatga-3'	391° C	61° C
G3PDH1 2-	5'-atcccgcactgtcgaagaatgtt-3'		
G3PDH2 1+	5'-ccagatgttgcgggtttcag-3'	317 bp	61° C
G3PDH2 2-	5'-cttttgccattcagcatctcag-3'		
Actin 3+	5'-cgtgccgtctcccgtctatct-3'	265 bp	60° C
Actin 4-	5'-ggttcgcttgggttgagtg-3'		
Tub 3+	5'-cgccacggccgctacctgact-3'	318 bp	60° C
Tub 4-	5'-tacgcgcttctctgcacc-3'		
Bag 3+	5'-gaccggtcgcctctcaacagc-3'	295 bp	60° C
Bag 4-	5'-cgcgcaaaataaccggacact-3'		

Tab. 2: Oligonukleotide für die Expressionsanalyse im LightCycler

	Sequenz	Fragmentgröße	Annealing Temp
SCSa-KO_SacII/Spel 1+	5'-taccggaaggtaacgtattcgcaacatcac-3'	3256 bp	60° C
SCSa-KO_SacII/Spel 4-	5'-taactagtacacataaaaaccacggaatctg-3'		
Screen 1+	5'-ttttccgcttcgattgccacagg-3'	3873 bp	59° C
Screen 2-	5'-tcgccgaatctcagaagccagat-3'		
KO 6+	5'-gctggagctccaccgccaaggtaac-3'	2686 bp	59° C
TCA11 LC 2-	5'-gactgcctggagcgttct-3'		
Screen 1+	5'-ttttccgcttcgattgccacagg-3'	4968 bp	59° C
T7 Primer	5'-acccaacttaatcgcttgcagcac-3'		
SCSa 1+	5'-acatggtccgctcaaacagg-3'	750 bp	58° C
SCS_3'UTR 2-	5'-ctccgggtcgaagagactcg-3'		

Tab. 3: Oligonukleotide für die Konstruktion und den Nachweis des konditionalen Knock-outs

Genname	Sequenz
GPI	5'-agcacgaacctggatggcacga-3'
GAPDH1	5'-cgatgtcgtcttgggtgc-3'
PGK2	5'-gaccgactcagagctgttg-3'
PK2	5'-cgttgaagtgggagcgattac-3'
PDHE1a	5'-cttctcagcctcagctctca-3'
PDHE2	5'-cgataaagccgacatggatgtcg-3'
OGDHE3	5'-cgtcccgatcgacgaaaag-3'
Aco	5'-accagcaggggaaacccttc-3'
SucCoA	5'-gtttgagggagttgaggag-3'
FAD-MDH	5'-cattgtggcgacatctagacg-3'
PEP-Carb	5'-gaagagctggagaactcag-3'
GPM1	5'-gaattcggcgaaaacgggag-3'
GPM2	5'-gttcatgtactgccatgcac-3'
Tati 1+	5'-aaggggagcagttctcgaa-3'
Tati 2-	5'-ccctcgtcagctctccttat-3'
oligo dT	5'-ttttttttttttttt-3'
Adapter 1	5'-tctaag-3'
Adapter 2	5'-Pctaggcttaagatgca-3'

Tab. 4: Oligonukleotide zum Sequenzieren, für die cDNA Synthese, sowie zur Konstruktion des Adapters

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der humanen Vorhaut-Fibroblasten

Als Wirtszelllinie zur Kultivierung der Parasiten wurden ausschließlich humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) verwendet. Diese wurden in 175 cm² (T175) oder 25 cm² (T25) Zellkulturflaschen bzw. 24-Napf-Zellkulturschalen (24 well Platten) in DMEM mit 10 % FCS, und 1 % 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Pen-Strep) kultiviert. Nach spätestens fünf Wochen wurden sie zur Passagierung mit 10 ml 1 % EDTA in PBS gespült und dann mit 10 ml 0,25 % Trypsin-EDTA inkubiert, bis sie vollständig vom Untergrund abgelöst waren. Anschließend wurden sie in DMEM Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen-Strep aufgenommen, auf neue Zellkulturflaschen verteilt und bei 37° C unter 5 % CO₂-Zufuhr inkubiert.

2.2.1.2 Kultivierung und Isolierung von *Toxoplasma gondii*

2.2.1.2.1 Tachyzoiten

Die Tachyzoiten wurden auf T25-Zellkulturflaschen mit konfluent gewachsenen HFF-Zellrasen gegeben und in diesen in DMEM mit 1 % FCS und 1 % Pen/Strep inkubiert. Waren die Wirtszellen fast vollständig lysiert, erfolgte eine erneute Passage der Parasiten auf frische HFF-Zellen. Handelte es sich um stabil transfizierte Parasiten, so musste dem Medium noch der entsprechende Selektionszusatz zugegeben werden. Bei Selektion mit dem bakteriellen *cat*-Gen, erfolgte die Zugabe von Chloramphenicol auf eine Endkonzentration von 20 µM (Kim *et al.*, 1993). Für die Selektion auf das DHFR-TS Allele wurde Pyrimethamin in einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben (Donald und Roos, 1996).

2.2.1.2.1 Bradyzoiten

Die Stadienkonversion von Tachyzoiten läßt sich durch verschiedene Stressfaktoren induzieren, wie zum Beispiel durch Änderung des umgebenden pH-Wertes, der Temperatur, der Zugabe von IFN-γ bzw. NO, oder mitochondrialen Inhibitoren (Bohne *et al.*, 1993/ 1994, Soête *et al.*, 1994, Tomavo und Boothroyd, 1995). Als verlässlichste Methode hat sich eine

Alkalisierung des pH-Wertes erwiesen (pH-Shift), der standardmäßig zur Gewinnung von Bradyzoiten aus Zellkultur verwendet wurde.

Hierzu wurden konfluent wachsende humane Fibroblasten in 24-Napf Zellkulturschalen auf sterilen Glasplättchen (für eine spätere Untersuchung durch Immunfluoreszenz) oder 25 cm² Zellkulturflaschen (zur Isolierung von RNA) mit Tachyzoiten in DMEM/ 1 % FCS/ 1 % Pen/Strep infiziert und 3 h bei 37° C in einem Zellkulturinkubator unter CO₂-Begasung inkubiert. Nachdem die Parasiten in die Wirtszellen eingedrungen waren, erfolgte ein Austausch des Mediums gegen vorgewärmtes pH-Shift Medium. Die Kulturen wurden in einen Zellkulturinkubator ohne zusätzliche CO₂-Begasung transferiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumswechsel, bei dem extrazelluläre Parasiten gewaschen wurden. Nach der gewünschten Inkubationszeit (normalerweise vier Tage) konnten die Zellen entweder für Immunfluoreszenzfärbungen fixiert, oder für RNA-Gewinnung weiterbehandelt werden.

pH-Shift Medium

5 ml DMEM ohne NaHCO₃, Na-Pyruvat, L-Glutamin (Biochrom)

5 ml NaHCO₃ (7,5%)

10 ml Tricin (1 M, pH 8,2 bei 37° C)

5 ml Pen/Strep

5 % FCS

5 ml L-Glutamin (200 mM, Biochrom)

auf pH 8,2 (37° C) mit KOH

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längeren Lagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden Zellsuspensionen des entsprechenden Zellkulturmediums mit demselben Volumen 2x Einfriermedium gemischt und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden einige Tage in einem Styroporblock auf -80° C heruntergekühlt und später in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff in einem 37° C warmen Wasserbad angetaut, zügig in warmes Zellkulturmedium gegeben, gleichmäßig verteilt und bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, da das restliche DMSO des Einfriermediums das Wachstum der Zellen beeinflusste.

2x Einfriermedium

40 % DMEM

40 % FCS

20 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.2.1.4 Transfektion von *Toxoplasma gondii*

Das Einführen von doppelsträngiger Plasmid-DNA in Tachyzoiten erfolgte mittels Elektroporation durch einen BTX-ElectroCell Manipulator.

Die Parasiten wurden nach 40 h mit ihren Wirtszellen abgeschabt und durch eine dreifache Passage durch Kanülen (20G; 26G) von diesen befreit. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 5 min bei 400 Upm, um die Tachyzoiten von den Zellen zu trennen. In einem zweiten Zentrifugationsschritt von 10 min bei 2000 Upm, wurden die Parasiten dann pelletiert. Nach der Aufnahme des Pellets in 10 ml Cytomix und dem Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer erfolgte eine weitere Zentrifugation von 10 min bei 2000 Upm und das Einstellen der Parasitenkonzentration auf 1×10^7 Parasiten / 350 μ l Cytomix+ATP+GSH.

Pro Transfektionsansatz wurden 350 μ l Parasitensuspension und 50 μ g Plasmid-DNA mit 50 U Restriktionsenzym, welches zum linearisieren des Plasmides genutzt worden war, gemischt und luftblasenfrei in eine 2 mm Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV (maximum voltage range), 48 Ω (resistance timing) mit 1,5 kV angelegter Spannung.

Nach einer kurzen Ruhepause von ca. 10 min wurden die transfizierten Tachyzoiten in T25 Zellkulturflaschen mit konfluentem Zellrasen und DMEM / 1 % FCS / 1 % Pen/Strep überführt und bei 37° C im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach ca. 4 h erfolgte ein Mediumwechsel.

Cytomix

120 mM KCl

0,15 mM CaCl₂10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,6

25 mM HEPES

2 mM EDTA

5 mM MgCl₂

auf pH 7,6 mit KOH

Cytomix/ GSH/ ATP

6 mg ATP

8 mg Glutathion

in 10 ml Cytomix

2.2.1.4.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Da die Transfektionsbedingungen, und hierbei vor allem die angelegte Spannung bei der Transfektionseffizienz eine starke Rolle spielen und diese in Abhängigkeit vom transfizierten *T. gondii* Stamm stark variieren können, mussten die optimalen Transfektionsbedingungen für diesen Stamm erst ausgetestet werden.

Hierzu wurden 1×10^7 Tachyzoiten in 350 μ l Cytomix / GSH / ATP mit 50 μ g des Plasmides pKS-ROP / β -Gal mit unterschiedlicher Spannung elektroporiert und auf frische HFF-Zellen gegeben.

Nach 24h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 2x mit 1x PBS gewaschen, für 10 min mit einer Fixierlösung fixiert und die Zellen mit einer frisch angesetzten X-Gal-Färbelösung für ca. 3 h bei 37° C inkubiert.

Abschließend wurde ein weiteres mal gewaschen und am Zellkulturmikroskop ausgewertet.

Der Vektor pKS-ROP / β -Gal enthielt das Gen *lacZ*, welches für die bakterielle β -Galaktosidase von *Escherichia coli* kodiert und unter der Kontrolle des *T. gondii* Promoter *rop1* steht. Eine erfolgreiche Expression des Enzyms wurde durch eine Blaufärbung der Vakuolen nachgewiesen, da in diesem Fall das Substrat X-Gal umgesetzt werden konnte (Seeber und Boothroyd, 1996). Durch das Auszählen der blauen Vakuolen zur Gesamtzahl der Vakuolen konnte die Transfektionseffizienz ermittelt werden. Es zeigte sich, dass die Parasiten des RH-Tati Stammes im Allgemeinen mit einer Effizienz von 40 % bis 60 % transfiziert wurden.

Fixierlösung

2 % Formaldehyd
0,2 % Glutaraldehyd
2 mM MgCl₂
0,02 % Triton X-100
0,04 % Desoxycholat
ad 1x PBS

X-Gal Färbelösung

1 mg/ml X-Gal (Stammlösung 40 mg /ml)
1,3 mM MgCl₂
0,02 % Triton X-100
3 mM K₄Fe(CN)₆
3 mM K₃Fe(CN)₆
0,04 % Desoxycholat
ad 1x PBS

2.2.1.5 Klonierung von *T. gondii*

Um aus einer polyklonalen Population an transfizierten Parasiten nach Selektion Klone mit definiertem Genotyp zu gewinnen, ist es nötig, diese zu klonieren. Im Falle von *Toxoplasma gondii* erreicht man dies durch Verdünnungsreihen auf einer mit Wirtszellen beschichteten Mikrotiterplatte, indem man mit einer definierten Anzahl an Parasiten startet und diese so weit herunter verdünnt, bis nur noch ein Klon pro einem Napf der Mikrotiterplatte vorhanden ist.

Hierzu wurden zuerst Mikrotiterplatten mit HFFs beschichtet. HFFs wurden gesplittet und in DMEM/ 10 % FCS/ 1 % Pen-Strep aufgenommen. Mit einer Mehrkanalpipette wurden in jeden Napf einer Mikrotiterplatte 200 µl der Zellsuspension gegeben und diese im Brutschrank bei 37° C unter CO₂-Begasung inkubiert, bis die Zellen konfluent waren.

Das Medium wurde abgesaugt und gegen 100 µl DMEM / 1 % FCS / 1 % Pen-Strep mit 20 µM Chloramphenicol pro Napf ersetzt. Die zu klonierenden Parasiten wurden mit dem Zellrasen abgeschabt und durch Kanülen gepresst, um die Wirtszellen zu zerstören und die Toxoplasmen aus diesen zu befreien. Die Anzahl der Parasiten wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Konzentration der Parasiten auf 1×10^5 / ml mit dem für die Passage der Parasiten verwendeten Medium eingestellt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden je 100 µl dieser Parasitensuspension aufgenommen und in die erste Reihe Näpfe der Mikrotiterplatte pipettiert. Der Inhalt der Pipette wurde vorsichtig mit dem Medium in der Mikrotiterplatte vermischt und daraus 100 µl in die nächste Reihe pipettiert. Auf diese Weise wurden pro 96-Napf Platte 16 Verdünnungsreihen erstellt mit einem Verdünnungsfaktor von zwei pro Reihe. Die letzten 100 µl jeder Verdünnungsreihe wurden verworfen. Nach sechs Reihen enthält ein Napf theoretisch 3,125 Parasiten- also immer noch mehr als einen Klon. Da allerdings nicht jeder ausgezählte Parasit eine Wirtszelle infiziert, reicht dieser Wert in den meisten Fällen aus, um die Parasiten effektiv zu klonieren.

Die so behandelten Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank bei 37° C und CO₂-Begasung für sechs Tage inkubiert, ohne die Platten während dieser Zeit zu bewegen. Die Parasiten vermehren sich in den Zellen und lysieren diese. Die freigewordenen Parasiten infizieren umliegende Zellen und vermehren sich in diesen, so dass nach einiger Zeit ein Plaque im Zellrasen an den Stellen entsteht, an denen ursprünglich ein Parasit eine Zelle infiziert hatte. Plaques wurden im Lichtmikroskop gesucht und der Inhalt von Näpfen mit nur einem Plaque weiter passagiert.

2.2.1.6 Immunfluoreszenztest

Der Nachweis einer Proteinexpression kann durch spezifische Antikörper erfolgen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Dadurch können die Proteine unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar und auch innerhalb der Zelle lokalisiert werden.

Für diesen Test wurden HFF-Wirtszellen in 24-Well (Napf)-Platten angezogen, welche mit Deckgläschen (Durchmesser 13 mm) ausgelegt waren. Nach konfluentem Wachstum erfolgte eine Infektion mit den zu untersuchenden *T. gondii* Parasiten.

Die Zellen wurden nach 24 h mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd oder Methanol (je nach Antikörper) für 10 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,25 % Triton X-100 für 20 min bei RT. Dieser Schritt unterblieb bei einer Methanolfixierung.

Die fixierten Zellen wurden für mindestens 1 h mit einer Blockierlösung aus 1% BSA in 1x PBS blockiert, und anschließend mit dem Primärantikörper (in 1 % BSA / in 1x PBS verdünnt) für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem 10 min waschen mit 1x PBS erfolgte eine weitere 1 h Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (in 1 % BSA / in 1x PBS verdünnt).

Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die Zellen dreimal je 10 min mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette aus den Wells gehoben, kurz in entmineralisiertes Wasser getaucht und dann mit 10 µl Mowiol pro Deckgläschen auf einen Objektträger aufgebracht. Dabei wurde die mit den Zellen beschichtete Seite nach unten auf den Objektträger gelegt. Die fertigen Präparate wurden dann über Nacht bei 4° C getrocknet und konnten anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Blockierlösung

1 % BSA
0,0 2% NaN₃
in PBS

Mowiol

2,4 g Mowiol 4-88
6,0 g Glycerol
6 ml H₂O bidest.
12 ml 0,2 M Tris / HCl, pH 8,5
bei 4° C rühren, bis klare Lösung entsteht
Inkubation bei 50° C, 10 min
Zentrifugation für 15 min, 5000 g
Überstand bei -20° C aufbewahren

2.2.1.7 RNA-Isolierung aus *Toxoplasma gondii*

Die Analyse von Genexpressionen erfolgte durch eine quantitative RT-PCR. Dafür wurde die Gesamt-RNA von den intrazellulären Parasiten und den HFF-Wirtszellen isoliert, indem der Zellrasen abgeschabt und die Zellsuspension für 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert wurde. Nach dem Entfernen des Mediums, wurde das Zellpellet in Lysepuffer des GenElute Mammalian Total RNA Kits (Sigma) aufgenommen. Dies wurde über eine Säule filtriert und das Filtrat in Ethanol (70 %) aufgenommen. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation über eine neue Säule, wobei die RNA an die Säulenmatrix gebunden wurde. Nach mehreren Waschschritten konnte die isolierte RNA von der Säule eluiert werden. Um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA zu vermeiden, erfolgte anschließend eine Behandlung mit RNase-freier DNase I (Sigma), mit nachfolgender Inaktivierung für 10 min bei 70° C.

Eine Unterscheidung zwischen der RNA von *T. gondii* und der RNA der Wirtszellen war erst während der quantitativen RT-PCR durch den Einsatz von spezifischen *T. gondii* Primern möglich.

2.2.1.8 cDNA Synthese

Ein charakteristisches Merkmal eukaryotischer mRNAs stellt der Poly-A-Schwanz am 3'-Ende dar. Dieser wird für die cDNA-Synthese ausgenutzt, da hier ein Oligo-dT Oligonukleotid binden kann, um die Reaktion einzuleiten. Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde eine M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Point Mutant (Promega) eingesetzt. Dazu wurde die RNA mit RT-Puffer, dNTPs, Oligo-dT Primer, der Reversen Transkriptase und einem RNase Inhibitor rRNasin (Promega) versetzt. Dieser Ansatz wurde für ca. 3 h bei 37° C inkubiert. Die auf diese Weise hergestellte cDNA wurde anschließend mit Bindepuffer versetzt und über eine Säule (Qiagen PCR Purification Kit) aufgereinigt. Die auf diese Weise hergestellte cDNA konnte über längere Zeit bei -20° C gelagert werden.

2.2.1.9 Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus *T. gondii*

Für die Synthese des Knock-out Fragmentes und der Verifizierung der gezielten Insertion des Knock-out Plasmides musste genomische DNA von *T. gondii* isoliert werden. Dafür wurden extrazelluläre Parasiten durch Filtration von ihren Wirtszellen getrennt, abzentrifugiert, in

Lysepuffer aufgenommen und für 1 h bei 55° C mit einer Protease inkubiert. Anschließend erfolgte ein RNase-Verdau sowie eine Inaktivierung der Enzyme für 10 min bei 70° C. Die Suspension wurde auf eine Säule zentrifugiert, mehrmals gewaschen und mit vorgewärmten Elutionspuffer wieder von der Säule gelöst. Abschließend erfolgte eine EtOH-Fällung um die gDNA weiter zu konzentrieren.

2.2.1.10 Mykoplasmen Test

Um sicherzustellen, dass die Zellen nicht mit Mykoplasmen kontaminiert waren, wurde in regelmäßigen Abständen ein Mykoplasmentest mit Hoechst-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden konfluent auf Glasplättchen angewachsene HFFs in 24- Well Platten mit den zu untersuchenden Toxoplasmen infiziert und über Nacht bei 37° C in DMEM/ 1% FCS/ 1% Pen / Strep im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Pfa / PBS für 10 min fixiert und 15 min mit 0,25 % Triton X-100 / PBS permeabilisiert.

Anschließend wurden sie 60 min mit 50 ng / ml Hoechst 33258 in PBS inkubiert, dreimal 10 min mit PBS gewaschen und wie in der Immunfluoreszenzfärbung mit Mowiol eingedeckelt. Der Hoechst 33258 Farbstoff färbt DNA intensiv an und kann durch blaue Fluoreszenz an einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Da sowohl die DNA der Wirtszellen, als auch der Parasiten und möglicher Mykoplasmen angefärbt wurde, konnten mit Mykoplasmen infizierte Zelllinien ausgesondert werden. Diese wurden sofort vernichtet und neue Chargen an Zellen aufgetaut.

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 Nukleinsäuren

2.2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit den Mini- und Maxipräp Kits der Firma Sigma nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden die Bakterien in Gegenwart von RNase nach dem Prinzip der alkalischen Lyse lysiert und die Lysate durch Zentrifugation von Proteinen und genomischer DNA befreit. Die klaren Lysate wurden daraufhin auf Säulen gegeben, und die Plasmid-DNA an die Silika-Membran

der Säulen gebunden. Weitere Verunreinigungen wurden durch Waschschrirte entfernt und die reine Plasmid-DNA in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen.

2.2.2.1.2 Alkoholische Fällung von DNA

DNA wurde zur Abtrennung von Proteinen und/ oder niedermolekularen Substanzen aus wässrigen Lösungen in Alkohol gefällt. Die DNA wurde dazu mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol und 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt 30 - 60 min bei -20°C gefällt und im Anschluss 30min bei 14000 rpm und 4°C pelletiert. Bei geringen DNA-Konzentrationen erfolgte die Fällung über Nacht bei -80°C . Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um mitgefällte Salze zu lösen, und der restliche Alkohol abgesaugt. Nachdem das Pellet für etwa 10 min an der Luft getrocknet war, konnte es in dem gewünschten Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder Cytomix (zur anschließenden Transfektion in *Toxoplasma gondii*) aufgenommen werden.

2.2.2.1.3 Modifikation von DNA

2.2.2.1.3.1 Enzymatische Reaktion

Alle Restriktionsenzyme wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Zur Analyse von DNA Minipräparationen wurden 2 μl einer Minipräparation mit 1 U Restriktionsenzym versetzt und mit dem jeweiligen Puffer sowie wenn nötig mit BSA in 20 ml für ca. 3 Stunden bei 37°C (falls für das jeweilige Enzym keine andere Temperatur erforderlich war) inkubiert. Die geschnittene DNA konnte anschließend durch Agarosegelelektrophorese analysiert werden.

2.2.2.1.3.2 Dephosphorylieren von DNA

Wenn ein Insert in einen Vektor kloniert werden sollte, der mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, musste dieser zunächst dephosphoryliert werden, um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden. Hierzu wurde die Antarktische Phosphatase von New England BioLabs (NEB) verwendet.

Reaktionsansatz:

Vektor DNA linearisiert	1 µg
10x Puffer	1 µl
Antarktische Phosphatase (5 U / µl)	1 µl
Wasser	ad 10 µl

Der Ansatz wurde 15 min bei 37° C inkubiert und die Phosphatase für 5 min bei 65° C deaktiviert. Der dephosphorylierte Vektor konnte ohne weitere Aufreinigung für eine Ligation verwendet werden.

2.2.2.1.3.3 Ligation von DNA

Für eine Klonierung wurden sowohl Vektor als auch Insert mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut und auf einem Agarosegel augetrennt und die Entsprechenden Banden aus dem Gel extrahiert. Die Ligation erfolgte mit Hilfe einer T4 DNA Ligase (New England BioLabs), dazu wurden Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 gemischt, 10 µl 2xQuick-Ligase-Puffer sowie 1 µl DNA-Ligase (400 U /µl) zugegeben und auf ein Endvolumen von 20 µl mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für ca. 30 min inkubiert und bis zu einer Transformation in kompetente *E. coli* Zellen auf Eis gelagert.

2.2.2.1.4 DNA-Analyse**2.2.2.1.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Extinktion bzw. Absorption. Diese Relation wird bei einer spektralphotometrischen Quantifizierung von Nukleinsäuren ausgenutzt, indem von einer Verdünnung einer gereinigten Nukleinsäure die Absorption bei 260 nm im Spektralphotometer gemessen wird. Es gilt folgende Relation zwischen gemessener Absorption und Konzentration der Nukleinsäure:

$$\text{dsDNA } 1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg / ml}$$

$$\text{ssDNA } 1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ µg / ml}$$

$$\text{RNA } 1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg / ml}$$

Um ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung zu erhalten, kann der Quotient aus OD_{260} / OD_{280} gebildet werden. Bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung sollte dieser im Bereich von 1,7- 1,9 liegen.

2.2.2.1.4.2 Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen, wurden sie auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (Sambrook *et al.*, 1989).

Agarose wurde in TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und nach abkühlen auf 60° C mit 0,1 µg / ml Ethidiumbromid versetzt und zum Abkühlen in eine mit einem Kamm bestückte Flachgelapparatur gegossen. Nach Erstarren der Lösung wurde das Gel in einer Gelkammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 10x Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 5-10 V / cm in der Flachgelapparatur. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA konnte diese bei UV-Anregung auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei etwa 20 ng pro Bande.

TAE-Puffer

40 mM Tris
1 % Essigsäure
1 mM EDTA (pH 8,0)

10x Auftragspuffer

0,07 % Bromphenolblau
33 % Glycerin
7 % SDS
in TES-Puffer

TES-Puffer

50 mM Tris
5 mM EDTA (pH 8,0)
50 mM NaCl (pH 8,0)

2.2.2.1.4.3 DNA-Extraktion aus einem präparativen Agarosegel

Nach dem Auftrennen der DNA in einem Agarosegel, konnten die Banden auf einem Transilluminator unter UV-Licht (70 % der normalen Stärke, um DNA-Schäden zu vermeiden), mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) isoliert werden. Nach dem Auflösen des Fragments in QG-Puffer für 10 min bei 50° C (unter ständigem schütteln), wurde Isopropanol der Gellösung zugegeben. Anschließend erfolgt das Überführen auf eine Silika-Matrix Säule, auf der die DNA gebunden wurde. Nach mehreren Waschschritten, die Reste von Agarose und Puffer entfernten, wurde die DNA aus der Silika-Säule mit Wasser eluiert.

2.2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (nach Saiki *et al.*, 1988) wurde zur Anreicherung von spezifischen Zielsequenzen für die anschließende Klonierung verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der zyklischen Wiederholung von Denaturierung der template-DNA, Anlagerung der spezifischen Oligonukleotide (Primer) und der Neusynthese einer komplementären DNA-Sequenz durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Programms kommt es zu exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA.

Im Normalfall wurde für die PCR eine *Taq*- (*Thermus aquaticus*)-DNA-Polymerase (Roche) bzw. für sehr lange Fragmente die Extender Phusion DNA-Polymerase (NEB) verwendet. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, welche für weitere Klonierungen benötigt wurden, wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega) oder Phusion-DNA-Polymerase (NEB) eingesetzt. Diese besitzen eine 3'-5' Exonukleaseaktivität und weisen daher eine geringere Fehlerrate auf (Lundberg *et al.*, 1991).

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Template-DNA	50 – 100 ng
Primer 1 (10µM)	1 µM
Primer 2 (10µM)	1 µM
dNTPs (25 mM)	je 2,5 mM
10x / 5x Puffer	5 µl / 10 µl
DNA Polymerase	0,3-2 U
Obligat DMSO	1,5-2,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Da der Thermocycler einen beheizbaren Deckel besaß, musste nicht mit Mineralöl überschichtet werden. Nach Zugabe aller Reagenzien wurden die Reaktionsgefäße kurz an zentrifugiert und in den bereits auf 95° C vorgeheizten Block der PCR-Maschine gestellt.

Standardbedingungen einer PCR

Taq-DNA-Polymerase	Pfu-DNA-Polymerase	Phusion-High Fidelity DNA-Polymerase	DyNAzyme EXT DNA-Polymerase
96° C 5 min	92° C 2 min	98° C 30 s	94° C 4 min
92° C 1 min var° C 45 s 72° C var min 35x	95° C 1 min var° C 45 s 72° C var min 35x	98° C 10 s var° C 30 s 72° C var s 35x	94° C 30 s var° C 30 s 72° C var min 35x
72° C 15 min 4° C Pause	72° C 5 min 4° C Pause	72° C 10 min 4° C Pause	72° C 10 min 4° C Pause

Tab. 5: Standardbedingungen für eine PCR

Die Bedingungen des PCR-Protokolls wurden je nach Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes und der Primerkombination speziell in den Bereichen der Annealing-Temperatur und der Länge der Polymerisierungszeit abgewandelt.

2.2.2.1.6 Real-Time PCR

Um die Expression einzelner Gene quantitativ bestimmen zu können, wurden cDNA-Proben mit Hilfe der Real-Time PCR am LightCycler (Roche) untersucht (Higuchi *et al.*, 1992). Unter Verwendung des Fast Start DNA Master SYBR Green I Kits (Roche, Mannheim), wurden 4 µl Enzymmix mit jeweils 1 µl der entsprechenden genspezifischen Primern (25 µM), 9 µl Wasser und 5 µl cDNA gemischt und in eine Glaskapillare pipettiert. Im LightCycler wurde die Expression des zu untersuchenden Gens gemessen, wobei das Standardprotokoll in Abhängigkeit des eingesetzten Primerpaares variierte. Der Crossing Point (cp) jeder Probe wurde unter voreingestellten Bedingungen (Baseline Adjustment = Arithmetic) ermittelt.

Um die Expression verschiedener Gene miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Normalisierung der entsprechenden Expressionstärke mit Actin.

Da jeweils die Induktion eines Gens während der Differenzierung vom Tachyzoiten zum Bradyzoiten untersucht wurde, wurden die Induktionsfaktoren jedes untersuchten spezifischen Gens nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\mathbf{Exp}_{\text{Brady}}}{\mathbf{Exp}_{\text{Tachy}}} = \frac{2^{\Delta\text{Cp spez(Tachy-Brady)}}}{2^{\Delta\text{Cp Actin(Tachy-Brady)}}$$

Exp = Expression

Cp_{spez} = crossing point des spezifischen Gens

Cp_{Actin} = crossing point des dazugehörigen Aktin-Wertes

Tachy = Tachyzoiten

Brady = Bradyzoiten

Die PCR-Programme am LightCycler waren nahezu identisch aufgebaut und bestanden aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt mit nachfolgender Ampifizierung der entsprechenden DNA-Sequenz. Abschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Kontrolle einer Verfälschung der Expressionswerte durch die Synthese von unspezifischen DNA-Sequenzen, gefolgt von einem Kühschritt.

Nach Abhängigkeit des verwendeten Primerpaares und der Größe des zu amplifizierenden Gens wurden sowohl die Annealingtemperatur als auch die „extension“ Zeit variiert.

Ein typischen Programm im LightCycler ist in Tabelle 6 dargestellt:

Segment Nummer	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C / sec)	Acquisition Mode
Denaturierung				
1	95	600	20	None
Amplifikation (40 Zyklen)				
1	95	10	20	None
2	Var	5	20	None
3	72	Var	20	Single
Schmelzkurve				
1	95	10	20	None
2	65	15	20	None
3	99	0	0,1	Continuos
Kühlung				
1	40	30	20	None

Tab. 6: PCR-Programm im LightCycler

2.2.2.1.7 Subklonierung von PCR-Fragmenten

2.2.2.1.7.1 TOPO TA-Klonierung

Eine effiziente Klonierung von PCR-Produkten erlaubt der TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen). Hier erfolgt eine Subklonierung der gereinigten DNA-Fragmente in den bereits geschnittenen pCR4-Vektor, wobei die bei einer Amplifikation durch *Taq*-DNA-Polymerase entstehenden terminalen Desoxyadenosin-Überhänge (dATP) ausgenutzt werden. An den geschnittenen Vektor ist eine Topoisomerase gekoppelt, die eine Ligation bei Raumtemperatur innerhalb von 5 min erlaubt.

Wenn für die PCR-Reaktion *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet wurde, musste durch nachträgliche Inkubation des aufgereinigten PCR-Produktes in Gegenwart von dATP und *Taq* DNA-Polymerase in *Taq* DNA-Polymerasepuffer für 15 min bei 72° C ein nachträgliches Anfügen der terminalen Desoxyadenosin-Überhänge erreicht werden. Das in den Vektor ligierte PCR-Produkt wurde anschließend in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 transfiziert und auf Ampicillin-Resistenz der Zellen selektiert.

2.2.2.1.7.2 pDrive TA-Klonierung

Eine weitere Klonierung von PCR-Produkten erlaubt der QIAGEN PCR Cloning Kit (Qiagen). Dieser Kit wurde dann verwendet, wenn eine Überschneidung von Restriktionsschnittstellen im pCR4-Vektor von Invitrogen auftrat. Wenn für die PCR-Reaktion *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet wurde, musste durch nachträgliche Inkubation des aufgereinigten PCR-Produktes in Gegenwart von dATP und *Taq* DNA-Polymerase in *Taq* DNA-Polymerasepuffer für 15 min bei 72° C ein nachträgliches Anfügen der terminalen Desoxyadenosin-Überhänge erreicht werden

Der schon geschnittene Vektor wurde mit dem PCR-Fragmenten gemischt, es erfolgte die Zugabe des 2x Ligationsmixes, der eine DNA-Ligase enthielt, und eine 30 min Inkubation bei 12° C im Thermocycler. Anschließend wurde der Vektor in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α transfiziert.

2.2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*

2.2.2.1.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli* (CaCl₂-Methode)

Damit *Escherichia coli* Zellen Fremd-DNA aufnehmen können, müssen sie zuerst kompetent gemacht werden. Ausgehend von einer Einzelkolonie oder einem gefrorenen Aliquot des entsprechenden Stammes an *E. coli* Zellen wurde eine Übernachtskultur von 5 ml angesetzt und unter Schütteln bei 37° C inkubiert. 4 ml dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Morgen mit 100 ml vorgewärmtem (37° C) LB-Medium versetzt, die Kultur wieder bei 37° C unter Schütteln inkubiert und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,4 bis 0,5 wachsen lassen. Nach Erreichen der erforderlichen Zelldichte wurden die Zellen in 50 ml Zentrifugationsröhrchen auf Eis ca. 15 min abgekühlt und danach in einer vorgekühlten (4° C) Zentrifuge bei 4500 rpm und 4° C für 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem TfbI resuspendiert und 30 min auf Eis abgekühlt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 4 ml kaltem TfbII aufgenommen und Aliquots von 100 µl in Eppendorf-Caps bei -70° C gelagert.

TfbI

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
30 mM KAc
10 mM CaCl₂
15% (v/v) Glycerin
ad 50 ml
auf pH 5,8 mit Essigsäure einstellen

TfbII

10 mM MOPS; pH 7,0
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin
ad 50 ml
auf pH 7 mit HCl einstellen

Die steril filtrierte Lösungen können bei 4° C über mehrere Monate aufbewahrt werden.

2.2.2.1.8.2 Transformation CaCl₂ kompetenter *E. coli*

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit dem entsprechenden Vektor (Ligationsansatz bzw. 10-100 ng Plasmid DNA) versetzt. Nach einer 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein 30 s Hitzeschock bei 42° C im Wasserbad. Die Zellen wurden sofort wieder auf Eis gestellt und 250 µl LB-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde dann für eine Stunde bei 37° C geschüttelt, um eine Expression der Resistenzkassette des

transformierten Plasmids zu gewährleisten. Die Zellen wurden anschließend auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Sollte mit Hilfe des verwendeten Plasmids eine Blau/Weiß-Selektion erfolgen, so wurden vor dem Ausplattieren der Zellen die Platten mit jeweils 40 µl X-Gal (Stammlösung 40 mg / ml) und IPTG (Stammlösung 1M) supplementiert. Aus diesem Grund zeigten Kolonien, welche das Plasmid ohne das gewünschte Insert aufgenommen hatten eine Blaufärbung und konnten daher von weiteren Analysen ausgeschlossen werden.

2.2.2.2 Proteine

2.2.2.2.1 Immunisierung von Mäusen

Um Antisera gegen TgPDHE1_beta und TgPDHE2 zu gewinnen, wurden jeweils 4 Balb/c Mäuse (6 - 8 Wochen alt) mit den aufgereinigten His-Tag Fusionsproteinen von TgPDHE1_beta / TgPDHE2 immunisiert. Je 0,5 mg aufgereinigtes Protein in 2 ml PBS wurden in einem Fläschchen Adjuvans ABM-S (Antibody-Multiplier spezial, Linaris, Bettingen) nach den Angaben des Herstellers gelöst und mit diesem vermengt. Je 0,1 ml der Emulsion wurde intramuskulär in den Beinmuskel und subkutan in den Nacken jeder Maus gespritzt. Zur Nachboosterung nach zwei Wochen wurde ABM-N (Antibody-Multiplier normal, Linaris) verwendet, in dem jeweils 0,5 mg His-Tag Fusionsprotein gelöst worden war. Dieses wurde wie oben den Mäusen injiziert. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte eine weitere Boosterung mit ABM-N, um nach insgesamt sechs Wochen die Mäuse auszubluten. Nach 3 h bei Raumtemperatur wurde das inzwischen geronnene Blut 5 min bei 3000 rpm und 4° C abzentrifugiert, das Serum abgenommen und zur Konservierung mit 0,02 % NaN₃ versetzt.

2.2.2.2.2 Proteinbestimmung

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Prinzip nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine elektrophoretisch aufzutrennen, wurden diese auf SDS-Polyacrylamidgele geladen und im elektrischen Feld indirekt nach ihrer Größe aufgetrennt. Die zu untersuchenden Proteine wurden mit vierfach konzentriertem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:4 gemischt, 5 min auf 99° C erhitzt und auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Parallel wurde ein Gemisch von Markerproteinen bekannten Molekulargewichts aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) unter denaturierenden Bedingungen in 0,75 mm dicken Vertikalgelen durchgeführt. Für die Herstellung der Gele wurden zunächst die Trenngele mit ca. 12 % Polyacrylamid zum Nachweis von Proteinen unter 100 kDa in die Gelkammern gegossen. Bis zur vollständigen Polymerisation der Trenngele wurden sie vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Entfernen des Alkohols durch gründliches Waschen wurde ein 4,4 %iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach dem Probenauftrag erfolgte die Gelelektrophorese mit einem diskontinuierlichen Laufpuffer bei 25 mA pro Gel für etwa 90 min bis die Bromphenolblaufront aus dem Gel herauslief.

Trenngel, ca. 12 %

2,5 ml 750 mM Tris, pH 8,8

1,94 ml Acrylamid/ Bisacrylamid 30 % (30 / 0,8)

121 µl SDS 10 %

875 µl H₂O_{bidest}

20 µl APS 10 %

10 µl TEMED

Sammelgel, 4,4 %

1,25 ml 250 mM Tris, pH 6,8

250 µl Acrylamid/ Bisacrylamid 30 % (30 / 0,8)

25 µl SDS 10 %

1 ml H₂O_{bidest}

10 µl APS 10 %

10 µl TEMED

10 µl Bromphenolblau 1 %

Laufpuffer

25 mM Tris, pH 8,3
0,2 M Glycin
0,1 % SDS

Zweifach-Probenpuffer

20 % Glycerin
65 mM Dithiothreitol (DTT)
4 % SDS
0,004 % Bromphenolblau
125 mM Tris-HCl, pH 6,8

2.2.2.2.4 Coomassie Färbung

Um Proteine auf dem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurden die Gele nach Beendigung der Elektrophorese für mindestens 2 h bei Raumtemperatur in Coomassie Färbelösung geschwenkt (Weber *et al.*, 1972). Farbrückstände wurden anschließend durch Schwenken für 45 min in einem Entfärbegrad heraus gewaschen. Danach wurden die Gele in 1 % Glycerin in H₂O_{dest.} mit ebenfalls in dieser Lösung angefeuchteter Einmachfolie mehrere Tage in einem Rahmen getrocknet.

Coomassie-Färbelösung

50 % Methanol
10 % Essigsäure
0,1 % Coomassie Brilliant Blue

Coomassie-Entfärbelösung

10 % Methanol
5 % Essigsäure

2.2.2.2.5 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Semi-Dry-Blotting (Kyhse-Andersen, 1984) elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Membranen (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Amersham Buehler, Braunschweig) übertragen.

Der Aufbau der Transfermembran war wie folgt:

- Graphitelektrode (Kathode)
- 1 Filterpapier Dick
- 1 Whatmanpapier dünn
- SDS-Page Gel
- Nitrocellulose Membran
- 1 Whatmanpapier dünn

- 1 Filterpapier dick
- Graphitelektrode (Anode)

Alle Bestandteile der Transfereinheit, außer dem Gel, waren in Western-Blot Puffer getränkt und wurden während des Aufbaus feucht gehalten. Die Proteine wurden mit $0,8 \text{ mA/ cm}^2$ Transferfläche für 90 min auf die Nitrozellulose- Membran übertragen. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran anschließend für 2 min in Ponceau S Lösung inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt. Mit dieser Färbung konnte zusätzlich eine gleichmäßige Beladung aller Spuren kontrolliert werden. Um spezifische Proteine mittels einer Immunfärbung nachzuweisen, wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen über Nacht bei 4° C in Blockierlösung abgesättigt. Nach kurzem Waschen in Waschlösung wurde die Membran 2 h mit dem Primärantikörper in der angegebenen Konzentration in Inkubationslösung inkubiert. Nach $3 \times 10 \text{ min}$ Waschen in Waschlösung wurde 1 h mit dem Sekundärantikörper (Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG) in Inkubationslösung inkubiert. Anschließend wurde intensiv mit Waschlösung gewaschen (mind. $3 \times 20 \text{ min}$). Die Membran wurde ca. 2 min in Peroxidase-Färbelösung inkubiert bis ein Signal zu erkennen war und die Färbereaktion durch Waschen mit H_2O gestoppt.

Western Blot Puffer

25 mM Tris

150 mM Glycin

20 % Methanol

Blockierlösung

5 % Magermilchpulver

0,2 % Tween 20

0,02 % NaN_3

in PBS

Inkubationslösung

5 % Magermilchpulver

0,02 % Tween 20 in PBS

Waschlösung

0,02 % Tween 20

in PBS

Peroxidase-Färbelösung

1,25 ml 1 M Tris, pH 7,5

1,25 ml 10 % NiCl_2 15 μl 30 % H_2O_2

Spatelspitze 3,3'-Diaminobenzidin

22,5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

3. Ergebnisse

Der Kohlenstoffmetabolismus von *T. gondii* sollte durch die Identifizierung der Gene der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus sowie der Lokalisierung der entsprechenden Enzyme in den unterschiedlichen Kompartimenten näher charakterisiert werden. Für ein besseres Verständnis der Funktionalität des Zitronensäurezyklus sollten konditionelle Knock-out Mutanten generiert und deren Wachstumsverhalten studiert werden.

3.1 Identifizierung von Genen des C-Metabolismus in *T. gondii*

3.1.1 Strategie der Datenbank Recherche

Das Genom von *Toxoplasma gondii* war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vollständig sequenziert und bis August 2006 ist keine komplette Annotation verfügbar. Dagegen ist die Sequenzierung von Plasmodium, einem weiteren Mitglied der Familie der Apicomplexa, inzwischen abgeschlossen und ein Großteil der Gene auch annotiert und veröffentlicht worden. Auf Grundlage dieses Projektes konnte in der Sequenzdatenbank von Plasmodium (Bahl *et al.*, 2003; www.plasmoDB.org) nach den Proteinsequenzen der Enzyme des C-Metabolismus gesucht werden.

Als weitere Grundlage für eine Homologiesuche in *T. gondii* dienten die entsprechenden Proteinsequenzen der Modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae* (einfacher eukaryotischer Einzeller mit einem komplexen C-Metabolismus) und *Arabidopsis thaliana* (Ähnlichkeiten im Metabolismus zwischen Pflanzen und Apicomplexa durch die Anwesenheit des Apicoplasten), die ebenfalls in verschiedenen Datenbanken frei verfügbar sind.

Mit den erhaltenen Proteinsequenzen der drei Organismen erfolgte ein Homologievergleich (Aminosäuresequenz gegen translatierte DNA - TblastN) mit der bisher bekannten und in der Toxoplasma Datenbank (Kissinger *et al.*, 2003; www.toxodb.org) verfügbaren Genomsequenz von *Toxoplasma gondii*. Die erhaltenen *Toxoplasma gondii* Sequenzen mit der größten Homologie zu allen drei Spezies, wurden anschließend genutzt, um in der Protein-Datenbank der NCBI nach weiteren Übereinstimmungen zu suchen. Dieses Kreuzverfahren diente dazu, die erhaltenen Sequenzen weiter einzugrenzen und auf konservierte Domänen zu untersuchen.

3.1.2 Auswahl der Enzyme des C-Metabolismus

Die zentralen Stoffwechselwege des C-Metabolismus sind die Glykolyse, der daran anschließende Zitronensäurezyklus sowie die Verbindung zwischen den beiden Wegen durch den *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* (PDH). Die hieran beteiligten Enzyme sind in den folgenden Tabellen (7 – 10) aufgeführt und sollten in *Toxoplasma gondii* identifiziert werden.

Glykolyse	EC Nummer
<i>Hexokinase</i> (HK)	2.7.1.1
<i>Glucosephosphat-Isomerase</i> (GPI)	5.3.1.9
<i>Phosphofruktokinase</i> (PFK)	2.7.1.11
<i>Aldolase</i>	4.1.2.13
<i>Triosephosphat-Isomerase</i> (TPI)	5.3.1.1
<i>Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase</i> (GAPDH)	1.2.1.12
<i>Phosphoglycerat-Kinase</i> (PGK)	2.7.2.3
<i>Phosphoglycerat-Mutase</i> (PGM)	5.4.2.1
<i>Enolase</i> (ENO)	4.2.1.11
<i>Pyruvat-Kinase</i> (PK)	2.7.1.40

Tab. 7: Enzyme der Glykolyse mit Abkürzungen und den EC Nummern.

Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex	EC Nummer
<i>Pyruvat-Dehydrogenase E1 alpha</i> (PDH E1 α)	1.2.4.1
<i>Pyruvat-Dehydrogenase E1 beta</i> (PDH E1 β)	1.2.4.1
<i>Dihydrolipoly-Transacetylase</i> (PDH E2)	2.3.1.12
<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase</i> (PDH E3)	1.8.1.4

Tab. 8: Der *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* besteht aus drei Untereinheiten, wobei die E1 noch in E1alpha / beta unterteilt wird. Die E3 Untereinheit wird auch von dem α -*Ketoglutarat-Dehydrogenase -Komplex* genutzt

TCA-Zyklus	EC Nummer
<i>Citrat-Synthase</i> (CS)	2.3.3.1
<i>Aconitase</i>	4.2.1.3
<i>Isocitrat-Dehydrogenase</i> (IDH)	1.1.1.42
<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1 alpha</i> (OGDH E1α)	1.2.4.2
<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1 beta</i> (OGDH E1β)	1.2.4.2
<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E2</i> (OGDH E2)	2.3.1.61
<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E3</i> (OGDH E3)	1.8.1.4
<i>Succinyl-CoA-Synthetase alpha GTP</i> (SCSα)	6.2.1.4
<i>Succinyl-CoA-Synthetase beta GTP</i> (SCSβ)	6.2.1.4
<i>Succinyl-CoA-Synthetase ATP</i> (SCS-TPA)	6.2.1.5
<i>Succinat-Dehydrogenase</i> (SDH)	1.3.99.1
<i>Fumarase</i>	4.2.1.2
<i>Malat-Dehydrogenase</i> (MDH)	1.1.1.37

Tab. 9: Die Enzyme des TCA-Zyklus. Der *α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex* ist vergleichbar zum PDH-Komplex aufgebaut, und teilt mit diesem auch die E3 Untereinheit. Die *Succinyl-CoA-Synthetase* ist ein Homodimer Enzym, das aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist und bei dem man zwischen einer GTP und ATP spezifischen Beta-Untereinheit unterscheiden kann.

Weitere Enzyme, die diesen beiden Stoffwechselwegen angegliedert sind, bzw. Reaktionen katalysieren mit denen weitere Substrate zugeführt werden und daher für diese Arbeit interessant waren, sind in der Tabelle 10 aufgeführt.

Sonstige Enzyme	EC Nummer
<i>Glucosephosphat-Mutase</i> (GPM)	5.4.2.2
<i>FAD Malat-Dehydrogenase</i> (FAD MDH)	1.1.99.16
<i>Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase</i> (ATP) (PEP-CK)	4.1.1.49
<i>Pyruvat-Carboxylase</i> (PCBL)	6.4.1.1
<i>Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase</i> (NAD+) (G3PDH)	1.1.1.8
<i>Phosphoenolpyruvat-Translocator</i>	

Tab. 10: Enzyme, die dem C-Metabolismus zugeordnet sind. *Glucosephosphat-Mutase* katalysiert die Umwandlung von Glucose-1-phosphat zu Glucose-6-phosphat, welches dann in die Glykolyse eingespeist wird, dem letzten Schritt des Glykogen Abbaus. Die *FAD Malat-Dehydrogenase* führt die gleiche Reaktion aus wie die *NAD Malat-Dehydrogenase*, nur ist hier der Elektronenakzeptor FAD, *Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase* und *Pyruvat-Carboxylase* sind Enzyme der Gluconeogenese. Die *Pyruvat-Carboxylase* wandelt Pyruvat in Oxalacetat um, während die *Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase* den Schritt von Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat katalysiert. Die *Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase* hat mehrere Funktionen, zum einen katalysiert sie die Reaktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat, das dann als Elektronentransporter zur ATP Generierung in der oxidativen Phosphorylierung genutzt werden kann, bei der die reverse Reaktion von einer mitochondrialen Isoform katalysiert wird. Zum anderen kann das entstandene Glycerin-3-phosphat auch für die Phospholipidsynthese genutzt werden. Der *Phosphoenolpyruvat-Translocator* ist ein C₃-Transporter.

Wie unter 3.1.1 ausgeführt, wurden von diesen Enzymen die entsprechenden Proteinsequenzen ausgewählt und für die Homologiesuche in der Toxoplasma Datenbank eingesetzt.

3.1.3 Gene des C-Metabolismus in *Toxoplasma gondii*

Im Genom von *Toxoplasma gondii* konnten nicht nur die erwarteten Gene für die Enzyme der Glykolyse identifiziert werden, es wurden auch sämtliche Komponenten für einen funktionellen Tricarbonsäure-Zyklus gefunden, ebenso die Gene für die anderen gesuchten Enzyme. Als Kontrollen für die angewandte Methode zur Identifizierung dienten die schon beschriebenen und sequenzierten glykolytischen Enzyme *Hexokinase*, *Phosphofructokinase* und die beiden *Enolasen*, sowie die in der NCBI veröffentlichten Sequenzen der *Isocitrat-Dehydrogenase* und *Aconitase*. Während des Homologie-Vergleiches konnte die Anwesenheit aller gesuchten Kontrollsequenzen im Genom bestätigt werden (Tab. 11 – 14).

Ausgeschlossen aus der Analyse wurde die *Succinat-Dehydrogenase*, da sie in einer anderen Arbeit ausführlich beschrieben wird (Saleh *et al.*, 2006 in Präparation).

Die Suche nach den glykolytischen Genen brachte einige Besonderheiten im Genom von *Toxoplasma gondii* zutage. Von nahezu jedem Gen der Glykolyse konnten zwei Isoformen im Genom identifiziert werden, wie es schon für die *Enolase* beschrieben wurde (s. Tabelle 11).

Glykolyse	TgTwinScan	ID-Nr.	Chromosom
<i>Hexokinase</i>	TgTwinScan 3139	57.m00001	IX
<i>Glucosephosphat-Isomerase</i>	TgTwinScan 3430	76.m00001	V
<i>Phosphofruktokinase I</i>	TgTwinScan 6180	49.m03242	VI
<i>Phosphofruktokinase II</i>	TgTwinScan 5494	42.m00123	X
<i>Aldolase I</i>	TgTwinScan 2768	46.m00002	X
<i>Aldolase II</i>	TgTwinScan 2769	46.m03956	X
<i>Triosephosphat-Isomerase I</i>	TgTwinScan 5404	42.m00050	X
<i>Triosephosphat-Isomerase II</i>	TgTwinScan 5952	44.m02801	VIII
<i>Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase I</i>	TgTwinScan 0177	80.m00003	IX
<i>Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase II</i>	TgTwinScan 7206	59.m00091	VIII
<i>Phosphoglycerat-Kinase I</i>	TgTwinScan 2131	641.m00193	IV
<i>Phosphoglycerat-Kinase II</i>	TgTwinScan 2566	41.m1331	II
<i>Phosphoglycerat-Mutase I</i>	TgTwinScan 7493	59.m03656	VIII
<i>Phosphoglycerat-Mutase II</i>	TgTwinScan 0555	113.m00016	II
<i>Enolase I (ENO2)</i>	TgTwinScan 7172	59.m3410	VIII
<i>Enolase II (ENO1)</i>	TgTwinScan 7173	59.m3411	VIII
<i>Pyruvat-Kinase I</i>	TgTwinScan 6522	55.m00007	VIIIb
<i>Pyruvat-Kinase II</i>	TgTwinScan 6611	129.m00253	III

Tab. 11: Liste der vorhergesagten glykolytischen Enzyme in *Toxoplasma gondii*, mit der Angabe der inzwischen in der Datenbank den Sequenzen zugeordneten Identifikationsnummern, sowie der chromosomalen Lokalisation

Angefangen bei der *Phosphofruktokinase*, dem 3. Enzym der Glykolyse, bis zur *Pyruvat-Kinase*, dem letzten Enzym, gibt es eine Verdoppelung der Enzyme in diesem Stoffwechselweg.

Von den vier Untereinheiten des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* konnte jeweils nur eine Kopie im Genom identifiziert werden (s. Tabelle 12). Eine Ausnahme stellt allerdings die Untereinheit der *Dihydrolipoly-Dehydrogenase* dar, von der zwei Kopien vorhanden sind. Diese Untereinheit wird normalerweise von dem PDH-Komplex und dem α -Ketoglutarat-*Dehydrogenase*-Komplex geteilt.

Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex	TgTwinScan	ID-Nr.	Chromosom
<i>Pyruvat-Dehydrogenase E1 alpha</i>	TgTwinScan 4044	50.m03083	XII
<i>Pyruvat-Dehydrogenase E1 beta</i>	TgTwinScan 7445	59.m03618	VIII
<i>Dihydrolipoly-Transacetylase (PDH E2)</i>	TgTwinScan 4009	20.m00373	VIIa
<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase (PDH E3)</i>	TgTwinScan 1995	541.m01207	IX

Tab. 12: Vorhergesagte Untereinheiten des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* mit Identifikationsnummern und der chromosomalen Lokalisation

Obwohl sämtliche Komponenten für einen vollständigen Tricarbonsäure-Zyklus nachgewiesen werden konnten, gab es auch in diesem Fall einige Besonderheiten. Es wurden nicht nur zwei Isoformen der *Isocitrat-Dehydrogenase*, sondern auch der *Citrat-Synthase* gefunden. Desweiteren sind zwei verschiedene *Malat-Dehydrogenasen* vorhanden, von denen eine NAD als Co-Faktor benötigt und eine weitere die stattdessen bei der Reaktion frei werdenden Elektronen auf FAD überträgt.

Zitronensäurezyklus	TgTwinScan	ID-Nr	Chromosom
<i>Citrat-Synthase I</i>	TgTwinScan 7176	59.m03414	VIII
<i>Citrat-Synthase II</i>	TgTwinScan 3759	20.m03767	VIIa
<i>Aconitase</i>	TgTwinScan 5472	42.m03524	X
<i>Isocitrat-Dehydrogenase I</i>	TgTwinScan 4839	583.m00674	XI
<i>Isocitrat-Dehydrogenase II</i>	TgTwinScan 3209	57.m00028	IX
<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1alpha</i>	TgTwinScan 6380	49.m03397	VI
<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1beta</i>	TgTwinScan 6069	49.m00028	VI
<i>Dihydrolipoly-Transacetylase (OGDH E2)</i>	TgTwinScan 1592	38.m00017	XII
<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase (OGDH E3)</i>	TgTwinScan 3996	20.m03954	VIIa
<i>Succinyl-CoA-Synthetase alpha (GTP)</i>	TgTwinScan 0224	80.m00087	IX
<i>Succinyl-CoA-Synthetase beta (GTP)</i>	TgTwinScan 5198	42.m03311	X
<i>Succinyl-CoA-Synthetase (ATP)</i>	TgTwinScan 4552	583.m00592	XI
<i>Fumarase</i>	TgTwinScan 3243	57.m01846	IX
<i>Malat-Dehydrogenase</i>	TgTwinScan 2145	641.m00168	IV

Tab. 13: Vorhergesagte Enzyme des Zitronensäurezyklus mit Angabe der ID-Nummer und der chromosomalen Lokalisation

Bei den restlichen Enzymen dieser Studie wurden ebenfalls weitere Isoenzyme identifiziert, zum einen die zwei erwarteten Isoformen der *Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase*, des Weiteren zweimal die *Glucosephosphat-Mutase* und *Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase*.

Sonstige Enzyme	TgTwinScan	ID-Nr	Chromosom
<i>Glucosephosphat-Mutase I</i>	TgTwinScan 3526	76.m00002	V
<i>Glucosephosphat-Mutase II</i>	TgTwinScan 2158	641.m00009	IV
<i>FAD Malat-Dehydrogenase</i>	TgTwinScan 0081	80.m00006	IX
<i>Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase I (ATP)</i>	TgTwinScan 0175	80.m00002	IX
<i>Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase II (ATP)</i>	TgTwinScan 0193	80.m02252	IX
<i>Pyruvat-Carboxylase</i>	TgTwinScan 3452	76.m01567	V
<i>Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase I (NAD+)</i>	TgTwinScan 2421	26.m00234	IX
<i>Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase II (NAD+)</i>	TgTwinScan 2074	547.m00082	IX
<i>Phosphoenolpyruvat-Translocator</i>	TgTwinScan 6854	55.m10326	VIIb

Tab. 14: Vorhergesagte Enzyme mit Identifikationsnummern und genomischer Lokalisation

3.1.4 Homologieanalyse

Zur Überprüfung, ob die vorhergesagten Proteinsequenzen tatsächlich die gesuchten Enzyme des Kohlenstoffmetabolismus darstellten, erfolgte eine Homologieanalyse. Dabei wurden die ermittelten Proteinsequenzen mit einem „BlastP-Search“ verifiziert, bei dem die Aminosäuresequenz mit sämtlichen bisher bekannten Aminosäuresequenzen die in der Datenbank der NCBI eingetragen sind, verglichen wurde. Desweiteren konnte mit diesen Homologieanalysen eine erste Charakterisierung der identifizierten Enzyme vorgenommen werden. In den nachfolgenden Tabellen sind jeweils die drei Enzyme sowie der Organismus aufgeführt die die größte Ähnlichkeit zu den vorhergesagten Sequenzen aufweisen.

Die Identifikation der glykolytischen Enzyme konnte auf diese Weise komplett bestätigt werden, und die als Kontrolle mitgeführten, schon sequenzierten Enzyme *Hexokinase*, *Glucosephosphat-Isomerase*, *Aldolase I*, *Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase I* und *II*, *Enolase I* und *II* sowie die *Pyruvat-Kinase I* wurden auf diese Weise ebenfalls bestimmt. Damit konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit genutzte Methode zur Annotation der Gensequenzen erfolgreich war.

Die meisten Enzyme weisen eine Homologie zu denen von Plasmodium oder anderen Arten der Gattung Apicomplexa, wie *Cryptosporidium* oder *Eimeria*, auf. Bemerkenswert ist, dass bei den Enzymen mit mehreren Isoformen unterschiedliche Homologien auftreten. Die *Phosphofruktokinase I* weist eine größere Ähnlichkeit zu den beschriebenen Pyrophosphofruktokinasen von Apicomplexa auf, während die zweite Isoform eine größere Homologie zu denen von Pflanzen (*Citrus paradisi*, *Ricinus communis*, *Arabidopsis thaliana*) hat. Auch die beiden Isoformen der *Triosephosphat-Isomerase* zeigen unterschiedliche Übereinstimmungen, die *TPI I* hat eine größere Ähnlichkeit zu denen der Protozoen (*Tetrahymena thermophila*, *Theileria annulata*), *TPI II* dagegen eher zu Gräsern (*Secale cereale*, *Triticum aestivum*). Die zweite Isoform der *Phosphoglycerat-Kinase* und der *GAPDH* weisen starke Homologien zu denen von Algen auf, während die *Pyruvat-Kinase II* dadurch auffällt, dass sie eher zu denen von, zum Teil photosynthetisch aktiven, Bakterien passt (s. Tab.: 15).

Glykolyse	Homologie I	Homologie II	Homologie III
Hexokinase	Hexokinase [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Hexokinase [<i>Plasmodium falciparum</i>] 1e-99	Hexokinase [<i>Plasmodium berghei</i>] 3e-99
Glucosephosphat-Isomerase	Glucosephosphat-Isomerase [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Glucosephosphat-Isomerase [<i>Phytophthora infestans</i>] e-168	cytosolische Glucosephosphat-Isomerase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] e-165
Phosphofruktokinase I	pyrophosphate- Phosphofruktokinase [<i>Cryptosporidium parvum</i>]	pyrophosphate- Phosphofruktokinase [<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>]	Phosphofruktokinase [<i>Plasmodium berghei</i>]
Phosphofruktokinase II	pyrophosphat- Phosphofruktokinase beta subunit [<i>Citrus x paradisi</i>] e-124	pyrophosphat- Phosphofruktokinase beta subunit [<i>Ricinus communis</i>] e-123	Phosphofruktokinase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] e-122
Aldolase I	Aldolase [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Aldolase [<i>Cryptosporidium hominis</i>] e-139	Aldolase [<i>Cryptosporidium parvum</i>] e-139
Aldolase II	Aldolase [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Aldolase class-I [<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>]	Aldolase [<i>Plasmodium vivax</i>]
Triosephosphat-Isomerase I	Triosephosphat-Isomerase [<i>Tetrahymena thermophila</i>] 2e-70	Triosephosphat-Isomerase [<i>Theileria annulata</i>] 1e-69	Triosephosphat-Isomerase 1 [<i>Zea mays</i>] 1e-68
Triosephosphat-Isomerase II	Triosephosphat-Isomerase [<i>Secale cereale</i>] e-67	Triosephosphat-Isomerase [<i>Triticum aestivum</i>] 2e-67	Triosephosphat-Isomerase [<i>Oryza sativa</i>] 2e-65
Glycerinaldehyd-3- phosphate-Dehydrogenase I	Glycerinaldehyd-3- phosphate-Dehydrogenase [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Glycerinaldehyd-3- phosphate-Dehydrogenase [<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>] e-137	Glycerinaldehyd-3- phosphate-Dehydrogenase [<i>Plasmodium berghei</i>] e-136
Glycerinaldehyd-3- phosphate-Dehydrogenase II	Glycerinaldehyd-3- phosphate-Dehydrogenase [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Glycerinaldehyd-3- phosphate-Dehydrogenase [<i>Karenia mikimotoi</i>] 4e-128	chloroplast Glycerinaldehyd-3- phosphate-Dehydrogenase [<i>Karlodinium micrum</i>] e-128
Phosphoglycerat-Kinase I	Phosphoglycerat-Kinase [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7] 5e-145	Phosphoglycerat-Kinase [<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>] 3e-144	Phosphoglycerat-Kinase [<i>Neurospora crassa</i>] e-141
Phosphoglycerat-Kinase II	Phosphoglycerat-Kinase [<i>Isochrysis galbana</i>] e-125	Phosphoglycerat-Kinase [<i>Chondrus crispus</i>] e-118	Phosphoglycerat-Kinase [<i>Triticum aestivum</i>] e-115
Phosphoglycerat-Mutase I	Phosphoglycerat-Mutase [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7] 3e-40	Phosphoglycerat-Mutase [<i>Plasmodium berghei</i>] 3e-40	Phosphoglycerat-Mutase [<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>] 3e-37
Phosphoglycerat-Mutase II	Phosphoglycerat-Mutase [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7] e-104	Phosphoglycerat-Mutase [<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>] e-101	Phosphoglycerat-Mutase [<i>Plasmodium berghei</i>] e-101
Enolase I (ENO2)	Enolase 2 [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Enolase 1 [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Enolase [<i>Eimeria tenella</i>]
Enolase II (ENO1)	Enolase 1 [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Enolase 2 [<i>Toxoplasma gondii</i>] e-169	Enolase [<i>Eimeria tenella</i>] e-152
Pyruvat-Kinase I	Pyruvat-Kinase [<i>Toxoplasma gondii</i>]	Pyruvat-Kinase [<i>Eimeria tenella</i>]	Pyruvat-Kinase [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]
Pyruvat-Kinase II	Pyruvat-Kinase [<i>Nitrobacter hamburgensis</i>] 1e-81	Pyruvat-Kinase [<i>Rhodopseudomonas palustris</i>] 7e-81	Pyruvat-Kinase [<i>Bradyrhizobium japonicum</i>] 2e-80

Tab. 15: Ergebnisse Homologieblast der glykolytischen Enzyme

Bei den vier Untereinheiten des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* sieht es ähnlich aus. Sie weisen ebenfalls eine starke Homologie zu photosynthetisch aktiven Bakterien auf, diesmal allerdings zu Cyanobakterien (s. Tab. 16).

PDH-Komplex	Homologie I	Homologie II	Homologie III
Pyruvat-Dehydrogenase E1 alpha	Pyruvat-Dehydrogenase E1 alpha [Synechococcus elongatus] e-102	Pyruvat-Dehydrogenase E1 alpha [Thermosynechococcus elongatus] e-102	Pyruvat-Dehydrogenase E1 alpha [Anabaena variabilis] e-101
Pyruvat-Dehydrogenase E1 beta	Pyruvat-Dehydrogenase E1 beta [Synechococcus sp. RS9917] 6e-29	Pyruvat-Dehydrogenase E1 beta [Synechococcus elongatus] 2e-28	Pyruvat-Dehydrogenase E1 beta [Chaetosphaeridium globosum] 2e-28
Dihydrolipoly-Transacetylase (PDH E2)	dihydrolipoamide acetyltransferase [Thermosynechococcus elongatus BP-1] 2e-55	dihydrolipoamide S-acetyltransferase [Nostoc sp. PCC 7120] 7e-54	dihydrolipoamide acetyltransferase [Anabaena variabilis] 2e-53
Dihydrolipoly-Dehydrogenase (PDH E3)	Dihydrolipoly-Dehydrogenase [Anabaena variabilis] 8e-37	Dihydrolipoly-Dehydrogenase [Nostoc sp. PCC 7120] 2e-36	Dihydrolipoly-Dehydrogenase [Thermosynechococcus elongatus] 7e-36

Tab. 16: Ergebnisse Homologieblast PDH-Komplex

Bei den Enzymen des Zitronensäurezyklus führten die Ergebnisse der Analyse zu einer Korrektur bei zwei der bisherigen Vorhersagen. Zum einen zeigt die GTP spezifische beta Untereinheit der *Succinyl-CoA Synthetase* keine Homologie zu anderen *Succinyl-CoA Synthetasen* sondern sehr hohe Übereinstimmungen zu eukaryotischen ATP-spezifischen *Citrat-Lyasen* (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*) und wurde daher umdeklariert. Damit gibt es in *Toxoplasma gondii* nicht nur zwei, sondern drei Enzyme, die die Reaktion von Oxalacetat zu Citrate katalysieren. Bei einem weiteren Enzym konnte ebenfalls keine Übereinstimmung mit bisher bekannten Proteinen gefunden werden. Die als α -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1beta bezeichnete Untereinheit hat ausschließlich Homologien zu einer „Branched-Chain“ α -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1 Untereinheit, die bei der Degradation der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin eine wichtige Aufgabe hat. Sie gehört zu derselben Enzymklasse wie die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und ist ebenfalls aus drei Untereinheiten (E1, E2, E3) aufgebaut. Die anderen Enzyme des TCA-Zyklus zeigten hauptsächlich Ähnlichkeiten zu bekannten Enzymen von Apicomplexa (*Isocitrat-Dehydrogenase I*, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1/E2, ATP-*Succinyl-CoA Synthetase beta*), Protozoan (*Citrat-Synthase II*, *Fumarase*), Pflanzen (*Citrat-Synthase I*, *Dihydrolipoly-Dehydrogenase OGDH E3*, GTP-*Succinyl-CoA Synthetase alpha*) auf. Die *Isocitrat-Dehydrogenase I* zeigt nur Ähnlichkeiten zu eukaryotischen und die *Malat-Dehydrogenase* zu bakteriellen Enzymen (s. Tab. 17).

Zitronensäurezyklus	Homologie I	Homologie II	Homologie III
<i>Citrat-Synthase I</i>	<i>Citrat-Synthase</i> [<i>Daucus carota</i>] e-56	<i>Citrat-Synthase</i> [<i>Oryza sativa</i>] e-55	<i>Citrat-Synthase</i> [<i>Nicotiana tabacum</i>] e-55
<i>Citrat-Synthase II</i>	<i>Citrat-Synthase</i> [<i>Tetrahymena thermophila</i>] e-100	<i>Citrat-Synthase</i> [<i>Dictyostelium discoideum</i>] 4e-95	glyoxysomal <i>Citrat-Synthase</i> [<i>Cucurbita</i> cv. Kurokawa Amakuri] e-90
<i>Aconitase</i>	iron regulatory protein-like protein [<i>Toxoplasma gondii</i>]	iron-responsive element binding protein/aconitase, putative [<i>Theileria annulata</i>] e-120	<i>Aconitase</i> [<i>Dictyostelium discoideum</i>] e-118
<i>Isocitrat-Dehydrogenase I</i>	<i>Isocitrat-Dehydrogenase</i> (NADP) [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7] 4e-129	<i>Isocitrat-Dehydrogenase</i> [<i>Toxoplasma gondii</i>] 7e-127	<i>Isocitrat-Dehydrogenase</i> (NADP) [<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>] 9e-127
<i>Isocitrat-Dehydrogenase II</i>	<i>Isocitrat-Dehydrogenase</i> [<i>Toxoplasma gondii</i>]	<i>Isocitrat-Dehydrogenase</i> (NADP+) [<i>Bos taurus</i>] e-166	<i>Isocitrat-Dehydrogenase 2</i> (NADP+), mitochondrial [<i>Bos taurus</i>] e-166
<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1alpha</i>	<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1</i> [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1</i> [<i>Plasmodium berghei</i>]	<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1</i> [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1beta</i>	branched-chain <i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1</i> [<i>Theileria annulata</i>] e-128	branched-chain <i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1</i> [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7] e-127	branched-chain <i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1</i> [<i>Theileria parva</i>] e-125
<i>Dihydrolipoly-Transacetylase</i> (OGDH E2)	<i>dihydrolipoamide succinyltransferase</i> , [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7] 3e-84	<i>dihydrolipoamide succinyltransferase</i> , [<i>Plasmodium berghei</i>] 3e-84	<i>dihydrolipoamide succinyltransferase</i> , [<i>Theileria parva</i>] 9e-78
<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase</i> (OGDH E3)	<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase</i> [<i>Solanum tuberosum</i>] e-130	<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase</i> [<i>Lycopersicon esculentum</i>] e-129	<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase</i> [<i>Arabidopsis thaliana</i>] e-128
<i>Succinyl-CoA-Synthetase alpha</i> (GTP)	<i>Succinyl-CoA ligase alpha 1</i> [<i>Lycopersicon esculentum</i>] e-110	<i>Succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha</i> [<i>Danio rerio</i>] e-110	<i>Succinyl-CoA Synthetase alpha</i> [<i>Arabidopsis thaliana</i>] e-109
<i>Succinyl-CoA-Synthetase beta</i> (GTP)*	ATP <i>Citrate-lyase</i> [<i>Mus musculus</i>]	ATP <i>Citrate-lyase</i> [<i>Rattus norvegicus</i>]	ATP <i>Citrate-lyase</i> isoform 1 [<i>Homo sapiens</i>]
<i>Succinyl-CoA-Synthetase</i> (ATP)	ATP-spezifisch <i>Succinyl-CoA Synthetase beta</i> [<i>Dictyostelium discoideum</i>] e-119	ATP-spezifisch <i>Succinyl-CoA Synthetase beta</i> [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7] e-116	ATP-spezifisch <i>Succinyl-CoA Synthetase beta</i> [<i>Plasmodium berghei</i>] e-114
<i>Fumarase</i>	<i>Fumarate-hydratase</i> [<i>Trypanosoma brucei</i>]	<i>Fumarate-hydratase class I</i> [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)]	<i>Fumarate-hydratase</i> [<i>Theileria parva</i>]
<i>Malat-Dehydrogenase</i>	<i>Malat-Dehydrogenase</i> [<i>Toxoplasma gondii</i>] 7e-170	<i>Malat-Dehydrogenase</i> , (NAD) [<i>Rhodopseudomonas palustris</i>] 9e-116	<i>Malat-Dehydrogenase</i> [<i>Brucella abortus</i> biovar 1 str. 9-941] 3e-115

Tab. 17: Ergebnisse Homologieblast Enzyme des TCA-Zyklus. Die fett markierten Enzyme wurden neu annotiert

Die weiteren Enzyme zeigen dagegen ein sehr homogenes Muster. Die größten Homologien gehören zu Enzymen die bereits bei anderen Apicomplexa identifiziert wurden (s. Tab. 18).

Sonstige Enzyme	Homologie I	Homologie II	Homologie III
Glucosephosphat-Mutase I	Glucosephosphat-Mutase [Cryptosporidium parvum] e-174	Glucosephosphat-Mutase [Cryptosporidium parvum] e-173	hypothetical protein Chro.20343 [Cryptosporidium hominis] e-171
Glucosephosphat-Mutase II	Glucosephosphat-Mutase [Plasmodium chabaudi] e-136	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase [Plasmodium yoelii yoelii] e-134	Glucosephosphat-Mutase [Plasmodium falciparum 3D7] e-131
FAD Malat-Dehydrogenase	Quinone oxidoreductase [Plasmodium falciparum] e-145	malate:quinone oxidoreductase [Plasmodium chabaudi chabaudi] e-142	malate:quinone oxidoreductase, [Theileria annulata] e-132
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase I (ATP)	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase [Toxoplasma gondii] 2e-122	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase [Plasmodium berghei] 2e-57	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase [Plasmodium yoelii yoelii] 3e-57
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase II (ATP)	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase [Toxoplasma gondii] 2e-160	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase [Dictyostelium discoideum] 2e-132	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase [Plasmodium yoelii yoelii] 7e-131
Pyruvat-Carboxylase	Pyruvat-Carboxylase [Aedes aegypti]	Pyruvat-Carboxylase [Gallus gallus]	Pyruvat-Carboxylase [Mus musculus]
Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase I (NAD+)	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase [Theileria annulata] 4e-95	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase [Plasmodium chabaudi chabaudi] 7e-93	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (NAD+) [Cuphea lanceolata] 1e-85
Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase II (NAD+)	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase [Theileria annulata] 2e-105	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase [Plasmodium chabaudi chabaudi] 3e-104	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase 1 (soluble) [Danio rerio] 4e-91
Phosphoenolpyruvat-Translocator	Triose/Hexose Phosphat/Phosphat Translocator [Plasmodium falciparum] 4e-70	Phosphate-Translocator [Theileria parva] 3e-66	putative Glucose-6-Phosphat/Phosphat Translocator [Babesia bovis] 3e-62

Tab. 18: Homologieblast weitere Enzyme des C-Metabolismus

Die nach der Homologieanalyse neu annotierten Gene lauten:

Enzym	EC-Nr.:	TgTwinScan	ID-Nr	Chromosom
ATP Citrate-Lyase	2.3.3.8	TgTwinScan 5198	42.m03311	X
branched-chain α -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1	1.2.4.4	TgTwinScan 6069	49.m00028	VI

Tab. 19: Neue Annotation von Enzymen

3.1.5 Verifizierung des Startcodons

Bisher sind in *Toxoplasma gondii* noch keine einheitlichen Promotorstrukturen oder TATA-Boxen für den Transkriptionsstart beschrieben worden. Um das korrekte Startcodon für die Expression des jeweiligen Gens zu identifizieren, kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Zum einen wurde mit Hilfe von EST-Datenbanken der Bereich des

Transkriptionsstarts weiter eingegrenzt. Dabei erfolgte ein Vergleich der EST-Sequenz mit dem genomischen Bereich, und es wurde nach alternativen Startcodons (ATG) bzw. möglichen Stoppcodons, die in dem vermuteten „open reading frame“ (ORF) lagen, gesucht. Wurde zwischen dem vermuteten Startcodon und einem davor liegenden Stoppcodon kein weiteres ATG gefunden, galt der Transkriptionsstartpunkt als gesichert.

Zeigten die Analysen das Vorhandensein alternativer Startcodons an, erfolgte die Verifizierung des korrekten Initiationscodes mit Hilfe der PCR mit cDNA als Matrize. Die Auswahl der entsprechenden PCR-Primer richtete sich nach der Anzahl und der Lokalisierung der entsprechenden Startcodons. Während der Reverse-Primer innerhalb des kodierenden Bereich lag, wurden die Forward-Primer jeweils vor das zu untersuchende ATG, bzw. vor ein mögliches Stoppcodon, gelegt. So konnte überprüft werden, ob in dem Bereich eine Transkription stattfand oder nicht. Die erhaltenen Fragmente wurden anschließend sequenziert, um mögliche Unterschiede zwischen der vorhergesagten Sequenz und der tatsächlichen zu identifizieren und damit den Transkriptionsstart besser bestimmen zu können. Nach dieser Eingrenzung war es in den meisten Fällen möglich das endgültige Startcodon festzulegen. Eine endgültige Kontrolle erfolgte durch die Klonierung in einen Expressionsvektor mit einem myc-tag und dem Nachweis der erfolgreichen Expression (s. 3.2). Von einem grossteil der identifizierten Gene konnte so das Startcodon bestätigt werden, allerdings nicht von allen.

3.2. Lokalisierung der Isoformen

Um die Lokalisierung der einzelnen Isoformen zu untersuchen, wurde entweder der komplette oder wenigstens die ersten 1200 bp des ORF in einen Expressionsvektor kloniert, und der C-terminale Bereich mit einem myc-tag fusioniert. Die Lokalisierung erfolgte dann mittels einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen den myc-tag.

3.2.1 TetR^S Expressionssystem

Das von Meissner *et al.* entwickelte TetR^S Expressionssystem nutzt einen induzierbaren Tetrazyklinpromotor, der auf dem Resistenzoperon von *E. coli* beruht. Im Genom von *T. gondii* wurde ein Transaktivator integriert, der nach Zugabe von Anhydrotetracyclin (ATc) an den Promotor bindet und die Transkription des unter seiner Kontrolle stehenden Gens

unterdrückt (s. 3.4.1). Die so erhaltene *Toxoplasma gondii* Linie wurde als RH Tati bezeichnet (Meissner *et al.*, 2001).

Das für die Expression genutzte Plasmid pTet07Sag4-ACP-cmyc-DHFR, besitzt neben dem *E. coli* Tetrazyklinpromotor, einen myc-tag sowie als Resistenzmarker das *DHFR-TS* Gen. Für die Klonierung der ausgewählten Fragmente standen zwei Restriktionsschnittstellen zur Verfügung, am 5'-Ende *Nsi*I und am 3'-Ende *Avr*II. Da in der codierenden Sequenz (cfs) einiger Gene die Erkennungssequenz für die *Nsi*I Restriktionsendonuklease vorhergesagt wurde, musste eine alternative Schnittstelle für die Klonierung im 5'-Bereich integriert werden. Die Wahl fiel auf die A/T-reiche Erkennungssequenz von *Af*III, die daher im Genom von *T. gondii* seltener vorhanden ist. Die Schnittstellen waren so positioniert, dass nach der Integration des gewünschten Fragmentes der anschließende myc-tag im gleichen Leserahmen lag und nach der Transkription und Translation ein Fusionsprotein gebildet wurde. Das neu konstruierte Plasmid erhielt die Bezeichnung pTet07Sag4-ACP-cmyc-DHFR/*Af*III. Dieses Fusionsprotein konnte dann mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen werden. Um eine stabile Integration des Vektors zu gewährleisten, wurde auf die Resistenzkassette *DHFR-TS* durch Zugabe von Pyrimethamin selektioniert. Im Ausgangsplasmid befand sich als Platzhalter für die folgenden Klonierungen noch das *acp* Gen von *Toxoplasma gondii*, das durch das jeweilige Zielgen ersetzt wurde. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pTet07Sag4-Genabkürzung-DHFR (s. Abb. 3).

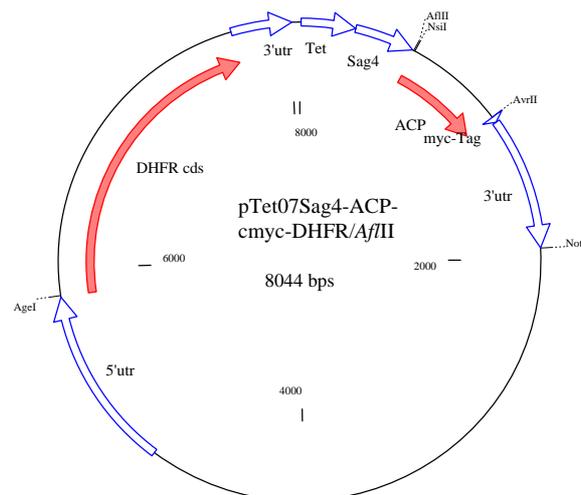


Abb. 3: Plasmidkarte pTet07Sag4-ACP-cmyc-DHFR/*Af*III. Die 3' und 5' UTRs wurden dem DHFR-Locus entnommen, der Promotor ist ein Fusionspromotor bestehend aus einem 7x tet aus *E. coli* und dem sag4 Promotor von *T. gondii*.

3.2.2 Klonierung der Kodierungssequenz der Zielgene

Für die Klonierung der identifizierten Gene erfolgte zuerst die Konstruktion eines cDNA-Pools des Tachyzoitenstadiums. Dafür wurde ein RH-Wildtyp Stamm ausgewählt, der sich in der Zellkultur schnell vermehrt und dem mausvirulenten Genotyp I angehört. Durch diese cDNA-Pools wurde sichergestellt, dass die für die PCR verwendete cDNA immer von gleicher Qualität war und keine stammspezifischen Unterschiede die Ergebnisse verfälschte.

Ziel der PCR war es, für jedes Gen den kompletten ORF zu amplifizieren. Die dabei verwendeten Primer bestanden aus den jeweiligen Restriktionsschnittstellen, mit denen die Sequenzen in den Tati-Vektor kloniert werden sollten, und aus den ersten bzw. letzten 19-24 Nucleotiden, allerdings mit Ausnahme des Stoppcodons, um eine Fusion mit dem myc-tag während der Translation zu ermöglichen. Den Forward-Primern wurde außerdem dreimal das Nucleotid A dem Startcodon vorangestellt, um eine Transkription zu erleichtern.

Die Auswahl der Restriktionsschnittstelle für den Forward-Primer erfolgte nach einer Analyse der vorhergesagten Sequenz. Konnte die Anwesenheit einer Erkennungssequenz für *NsiI* ermittelt werden, wurde ein Primer mit der Sequenz für *AflIII* konstruiert.

Die für die PCR eingesetzte Polymerase variierte je nach erwarteter Produktlänge. Für Fragmente größer 1000 bp erfolgte der Einsatz der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB), bei kleineren Sequenzen wurde die *Pfu*-Polymerase von Promega benutzt.

Da eine erfolgreiche Amplifikation des kompletten ORF nicht bei jedem Gen erreicht werden konnte, wurden für eine zweite PCR die Fragmente auf 1200bp verkürzt. Nach der PCR wurden die Sequenzen über ein Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten, aufgereinigt und in einen Zwischenvektor kloniert. Die Auswahl des Zwischenvektors hing von den verwendeten Restriktionsschnittstellen ab. Erfolgte eine Klonierung über die *NsiI/AvrII*-Schnittstelle, wurde der Topo pCR4-Vektor von Invitrogen genutzt, ansonsten der pDrive-Vektor von Qiagen, da das jeweils andere Plasmid eine dementsprechende Schnittstelle besitzt. Nach einer Restriktionsanalyse der erhaltenen Klone, wurde von dem positiven Klon das Insert herausgeschnitten und je nach verwendeter Schnittstellen Kombination in pTet07Sag4-cmyc-DHFR oder pTet07Sag4-cmyc-DHFR/*AflIII* kloniert. Anschließend erfolgte ein weiteres Screening nach positiven Klonen mittels Restriktionsanalyse.

3.2.3 Sequenzanalyse der amplifizierten Gene

Nach der Verifizierung der erfolgreichen Klonierung in den Tati-Vektor wurden die Inserts sequenziert und anschließend mit der theoretisch ermittelten Sequenz verglichen. Ein weiterer Vergleich erfolgte mit der inzwischen im Aufbau befindlichen Computerannotation der Betaversion der ToxoDB 4.0. Dabei sollten mögliche Unterschiede zwischen diesen ermittelt, Klonierfehler ausgeschlossen und eventuell eingeführte Mutationen identifiziert werden.

Für folgende Enzyme konnte jeweils der ORF vollständig oder teilweise bestimmt und kloniert werden, in Klammern ist die Länge der Proteine, sowie die Größe des klonierten Bereich und soweit vorhanden die NCBI ID-Nummer der hier neu annotierten Gene angegeben: *Hexokinase* (467 AA), *Glucosephosphat-Isomerase* (562 AA), *Phosphofruktokinase II* (500 von 1225 AA), *Aldolase I* (360 AA), *Triosephosphat-Isomerase I* (252 AA; DQ457194), *Triosephosphat-Isomerase II* (374 AA; DQ457193), *Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase I* (339 AA), *Phosphoglycerat-Kinase I* (416 AA; DQ451788), *Phosphoglycerat-Kinase II* (551 AA; DQ457189), *Phosphoglycerat-Mutase II* (264 AA; DQ457187), *Enolase 2* (444 AA), *Enolase 1* (428 AA), *Pyruvat-Kinase I* (530 AA), *Pyruvat-Kinase II* (400 von 987 AA), *Pyruvat-Dehydrogenase E1 alpha* (635 AA; DQ457185), *Pyruvat-Dehydrogenase E1 beta* (470 AA; DQ457186), *Dihydrolipoly-Dehydrogenase (PDH E3)* (353 AA), *Citrat-Synthase I* (400 von 560 AA), *Aconitase* (400 von 1055 AA), *Isocitrat-Dehydrogenase I* (400 von 517 AA), *Isocitrat-Dehydrogenase II* (419 AA), *Dihydrolipoly-Dehydrogenase (OGDH E3)* (519 AA; DQ457182), *Succinyl-CoA-Synthetase alpha (GTP)* (333 AA; DQ457192), *Succinyl-CoA-Synthetase (ATP)* (498 AA, DQ457191), *Malat-Dehydrogenase* (470 AA), *Glucosephosphat-Mutase I* (636 AA), *Glucosephosphat-Mutase II* (596 AA; DQ457190), *Branched-Chain α -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1* (463 AA; DQ457184), *FAD Malat-Dehydrogenase* (549 AA; DQ457183), *Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase I (ATP)* (500 von 570 AA), *Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase II (NAD⁺)* (400 AA) und *Phosphoenolpyruvat-Translocator* (352 AA).

Folgende Abweichungen zu bestehenden Annotationen wurden bei der Sequenzanalyse festgestellt. Die ermittelte Sequenz der *Aldolase I* entspricht der bekannten aus der NCBI-Datenbank, allerdings ist die in der ToxoDB beschriebene am 5'-Ende um 70AA länger. Gleiches gilt für die *Phosphoglycerat-Mutase II* für die ebenfalls ein anderes Startcodon und eine andere Intron/Exon Struktur im 5'-Bereich vorhergesagt wird. Dies konnte mit einer PCR allerdings nicht bestätigt werden.

Den inzwischen sehr gut beschriebenen *Enolasen*, deren ermittelte Sequenz mit denen in der NCBI übereinstimmt, werden von der Computerannotation der ToxoDB jeweils andere Startcodons, die 30-50AA früher liegen, zugeschrieben.

Ähnliche Differenzen treten bei der *Isocitrat-Dehydrogenase II* und der *Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase I* auf, auch hier wird in der Datenbank für beide Enzyme ein alternatives Startcodon genannt, das zu einer 176 bzw. 96 AA längeren Version führt.

Weder für die *Aldolase II* noch die *Phosphoglycerat-Mutase I* konnte der vollständige ORF bestimmt werden da in den erhaltenen PCR Sequenzen Stoppcodons in allen Leserahmen zu finden waren. Auch eine Variation der Startcodons führte zu keiner expressionsfähigen Sequenz.

3.2.4 *In silico*-Analysen

Eine erste Charakterisierung der ermittelten Proteinsequenzen erfolgte mit diversen im Internet frei verfügbaren Analyseprogrammen. Der Schwerpunkt lag in der Untersuchung der N-terminalen Sequenzbereiche, da hier Signalsequenzen vermutet wurden die einen ersten Aufschluss über die intrazelluläre Lokalisation geben sollten. Das Programm SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004) identifiziert Signalpeptide und macht Voraussagen zu möglichen Spaltsequenzen. Das Vorhandensein eines Signalpeptides am Anfang der Proteinsequenz ist ein mögliches Indiz für eine Lokalisation im Apicoplasten oder Mitochondrium. Ein alternatives Analyseprogramm ist „Predotar“ (Small *et al.*, 2004), das ebenfalls in der Lage ist Signalpeptide zum Transport ins ER sowie Transitpeptide für den Transport ins Mitochondrium bzw. in einen Plastiden zu identifizieren.

Weitere genutzte Programme sind das auf die Vorhersage von mitochondrialen Transportsignalen spezialisierte „Mitoprot II“ (Claros und Vincens, 1996) sowie „ChloroP“ (Emanuelsson *et al.*, 1999), welches für Pflanzen entwickelt wurde und mögliche Transportsequenzen von Proteinen in den Chloroplasten erkennen kann.

Vorhersageprogramme für die Lokalisation in den Apicoplasten sind bisher nur für Plasmodium entwickelt worden, und durch den großen Unterschied im G/C-Gehalt der beiden Spezies nicht für Toxoplasma nutzbar. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der *in silico* Analysen dargestellt. Bei den Sequenzen, wo das Startcodon und damit die kodierende Sequenz noch nicht experimentell bestätigt werden konnte, wurde die in der Datenbank vorhergesagte Sequenz verwendet. Diese Enzyme sind mit einem Stern markiert.

Enzyme	ChloroP	MitoprotII	Predator	Signal 3P
<i>Hexokinase</i>	no signal	Mito score 0,007	k.A.	non-secretory Protein
<i>Glucosephosphat-Isomerase</i>	no signal	Mito score 0,222	k.A.	non-secretory Protein
<i>Phosphofruktokinase I*</i>	no signal	Mito score 0,378	k.A.	non-secretory Protein
<i>Phosphofruktokinase II</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,042	k.A.	non-secretory Protein
<i>Aldolase I</i>	no signal	Mito score 0,232	k.A.	non-secretory Protein
<i>Aldolase II*</i>	no signal	Mito score 0,134	Plastid	non-secretory Protein
<i>Triosephosphat-Isomerase I</i>	no signal	Mito score 0,143	k.A.	non-secretory Protein
<i>Triosephosphat-Isomerase II</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,225	ER	signal-peptide
<i>Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase I</i>	no signal	Mito score 0,970	Mitochondrium	non-secretory Protein
<i>Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase II**</i>	no signal	Mito score 0,045	k.A.	signal-peptide
<i>Phosphoglycerat-Kinase I</i>	no signal	Mito score 0,064	k.A.	non-secretory Protein
<i>Phosphoglycerat-Kinase II</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,987	ER	signal-peptide
<i>Phosphoglycerat-Mutase I*</i>	no signal	Mito score 0,404	k.A.	non-secretory Protein
<i>Phosphoglycerat-Mutase II</i>	no signal	Mito score 0,925	Mitochondrium	non-secretory Protein
<i>Enolase I (ENO2)</i>	no signal	Mito score 0,302	k.A.	non-secretory Protein
<i>Enolase II (ENO1)</i>	no signal	Mito score 0,485	k.A.	non-secretory Protein
<i>Pyruvat-Kinase I</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,379	Plastid	non-secretory Protein
<i>Pyruvat-Kinase II</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,006	k.A.	signal-anchor
<i>Pyruvat-Dehydrogenase E1 alpha</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,058	Plastid	signal-anchor
<i>Pyruvat-Dehydrogenase E1 beta</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,452	ER	signal-peptide
<i>Dihydrolipoly-Transacetylase (PDH E2)</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,804	ER	signal-peptide
<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase (PDH E3)</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,560	Mitochondrium	signal-peptide
<i>Citrat-Synthase I</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,999	Mitochondrium	signal-peptide
<i>Citrat-Synthase II*</i>	no signal	Mito score 0,098	Plastid	signal-peptide
<i>Citrat-Synthase III*</i>	no signal	Mito score 0,362	k.A.	non-secretory Protein
<i>Aconitase</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,995	Mitochondrium	non-secretory Protein
<i>Isocitrat-Dehydrogenase I</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,996	Mitochondrium	signal-peptide
<i>Isocitrat-Dehydrogenase II</i>	no signal	Mito score 0,037	k.A.	non-secretory Protein

<i>α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1*</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,973	Mitochondrium	signal-peptide
<i>Dihydrolipoly-Transacetylase (OGDH E2)*</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,956	Mitochondrium	signal-peptide
<i>Dihydrolipoly-Dehydrogenase (OGDH E3)</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,865	Mitochondrium	non-secretory Protein
<i>Succinyl-CoA-Synthetase alpha (GTP)</i>	no signal	Mito score 0,730	Plastid	non-secretory Protein
<i>Succinyl-CoA-Synthetase (ATP)</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,935	Plastid	signal-peptide
<i>Fumarase</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,951	k.A.	signal-peptide
<i>Malat-Dehydrogenase</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,409	k.A.	signal-anchor
<i>Glucosephosphat-Mutase I</i>	no signal	Mito score 0,105	k.A.	non-secretory
<i>Glucosephosphat-Mutase II</i>	no signal	Mito score 0,503	k.A.	non-secretory
<i>Branched-Chain α-Ketoglutarat-Dehydrogenase E1</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,996	Plastid	non-secretory Protein
<i>FAD Malat-Dehydrogenase</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,987	Mitochondrium	non-secretory
<i>Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase I (ATP)</i>	no signal	Mito score 0,363	k.A.	non-secretory
<i>Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase II (ATP)*</i>	no signal	Mito score 0,069	k.A.	non-secretory
<i>Pyruvat-Carboxylase</i>	Chloroplast targeting	Mito score 0,345	Mitochondrium	non-secretory
<i>Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase I (NAD+)*</i>	no signal	Mito score 0,165	k.A.	non-secretory
<i>Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase II (NAD+)</i>	no signal	Mito score 0,962	k.A.	non-secretory
<i>Phosphoenolpyruvat-Translocator</i>	no signal	Mito score 0,068	k.A.	non-secretory

Tab. 20: Ergebnisse der *in silico* Analyse. Bei den Enzyme die mit einem * markiert sind, konnte die cds nicht experimentell bestätigt werden. Daher wurden die vorhergesagten Proteinsequenzen für die Analyse genutzt. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: Chloroplast targeting = Lokalisierung im Chloroplasten; no signal = kein Signalsequenz identifizierbar; Mito score = Wahrscheinlichkeit für die Lokalisierung im Mitochondrium 1 entspricht 100%; k.A. = keine Angabe für eine Lokalisation; Plastid = Lokalisation im Plastiden; Mito = mitochondriale Lokalisation; ER = Lokalisation im Endoplasmatischen Reticulum; non-secretory = Protein enthält keinerlei bekannten Signalsequenzen; signal-peptide = ein Signalpeptide für den Transport über das ER ist vorhanden; signal-anchor = nicht abspaltbare Signalsequenz

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den für diese Analyse genutzten Computerprogrammen keine eindeutige Vorhersage über die Lokalisation in den einzelnen Kompartimenten möglich ist, da die Ergebnisse zu widersprüchlich sind.

3.2.5 Transfektion in *Toxoplasma gondii*

Die Transfektion der konstruierten Tati-Plasmide in den RH Tati Stamm erfolgte wie in 2.2.1.4 beschrieben. Für eine Lokalisierung des exprimierten Proteins ist es normalerweise nicht notwendig auf eine stabile Transfektion zu selektionieren. Allerdings zeigten Färbungen

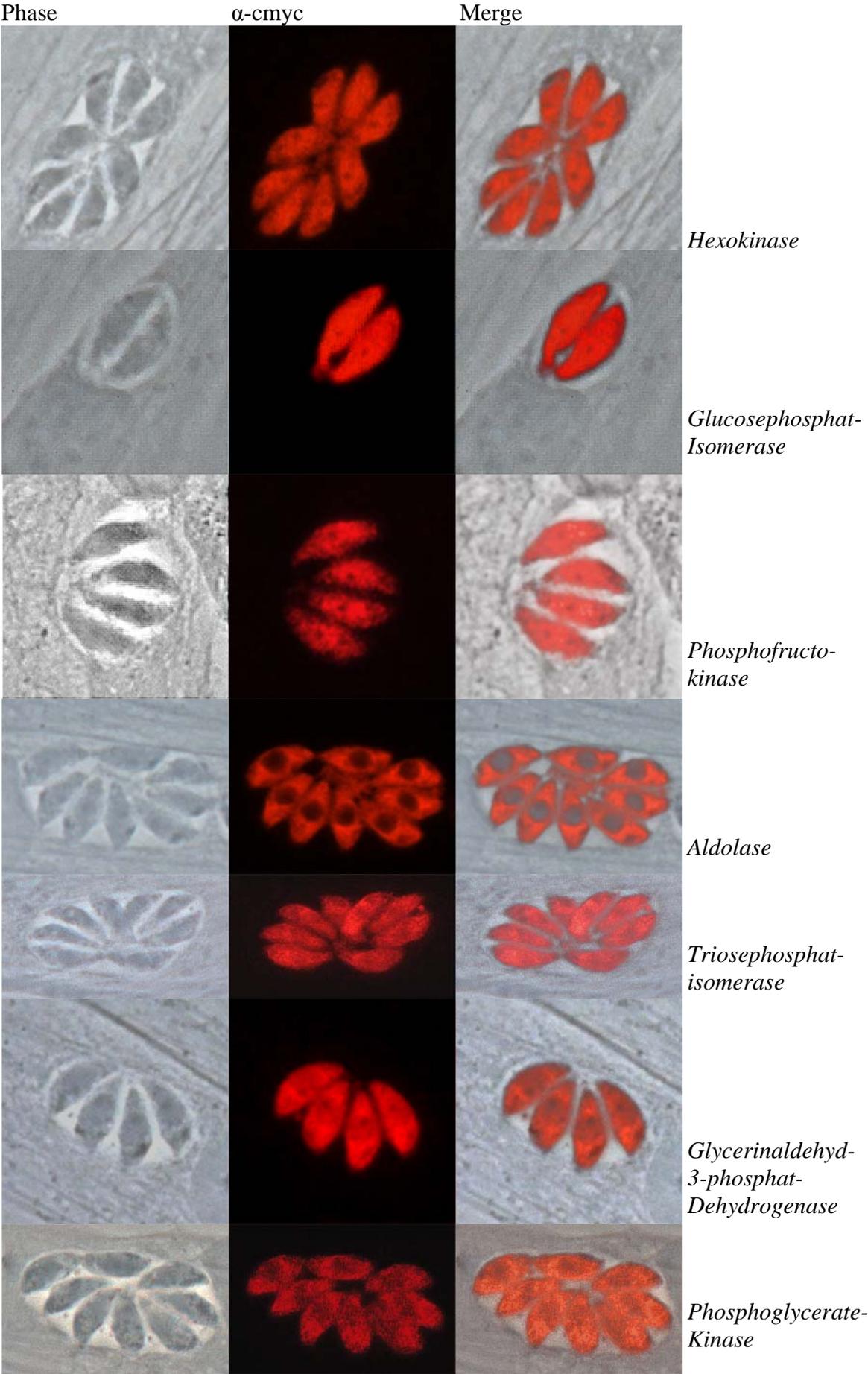
24 h nach erfolgreicher Transfektion im transienten Stadium häufig unspezifische Signale, so dass auf eine stabile Integration des Plasmides selektioniert wurde. Damit eine stabile Transfektion der Toxoplasmen erreicht werden konnte, wurde nach 24 h mit der Selektion begonnen, indem dem Medium Pyrimethamin (EK 2 μM / ml) zugeführt wurde. Nach zwei Passagen unter Selektionsdruck konnte davon ausgegangen werden, dass die transfizierten Parasiten das Plasmid stabil in ihr Genom integriert hatten.

Die für eine Co-Lokalisation notwendigen Markerplasmide enthielten ebenfalls eine Selektionskassette, allerdings für eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol. Die für eine Selektion notwendige Konzentration von Chloramphenicol richtete sich nach dem verwendeten Promotor des Resistenzgens, bei schwachen Promotoren 5 μM , bei starken 10 μM . Die Wirkung von Chloramphenicol tritt allerdings erst nach drei Selektionsrunden auf.

3.2.6 Lokalisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung

Für die Lokalisierungsexperimente wurden HFF-Zellen auf Glasplättchen in 24-Well Schalen angezogen und nachdem der Zellrasen konfluent war, mit den stabil transfizierten Parasiten infiziert. 24h nach der Infektion der Zellen erfolgte die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd in PBS, gefolgt von der Permeabilisierung der Zellen mit 0,25 % Triton X-100 in PBS. Die Detektion der exprimierten Proteine erfolgte durch eine indirekte Färbung des fusionierten myc-tags mit dem Erstantikörper Maus-anti-cmyc (Sigma; 1:250 in 1 % BSA / PBS) und einem Cy3-konjugierten Esel-anti-Maus Zweitantikörper (1:500 in 1 % BSA / PBS).

Die verwendeten Markerplasmide exprimierten ebenfalls Fusionsproteine. Als Kontrolle für eine mitochondriale Lokalisierung diente ein Konstrukt, bestehend dem *Grün-Fluoreszierenden-Protein* (GFP) und dem ribosomalen Protein S9, mit einer verkürzten Signalsequenz, die zum Transport ins Mitochondrium führt, pCAT S9(33-159)-GFP (DeRocher *et al.*, 2000). Eine Lokalisierung im Apicoplasten wurde ebenfalls mit einem Fusionsprotein, bestehend aus dem *Acyl-Carrier-Protein* (ACP), einem Enzym des Fettsäurestoffwechsels (Waller *et al.*, 1999) und dem *Gelb-Fluoreszierenden-Protein* (YFP), bestätigt. In den folgenden Abbildungen sind die Lokalisierungen der einzelnen Enzyme mit den Fusionsproteinen dargestellt (s. Abb. 4 - 10).



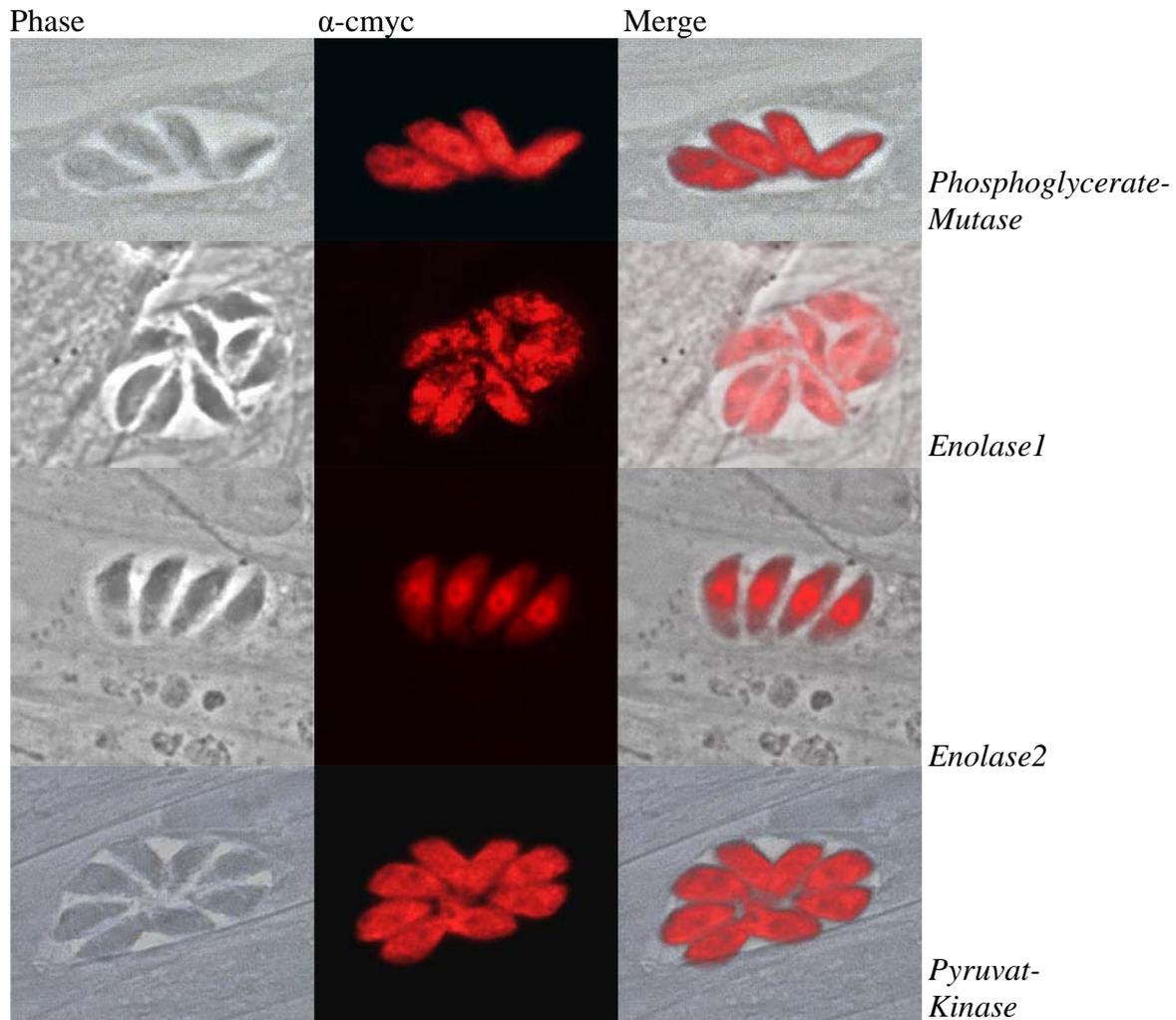


Abb. 4: Glykolytische Enzyme im Zytosol. Die Enzyme der Glykolyse wurden, wie erwartet, im Zytosol lokalisiert vorgefunden. Durch die unterschiedliche Tiefenschärfe ist in den Fluoreszenzbildern der Kern uneinheitlich ausgespart. Auffallend ist die die Lokalisierung der *Enolase2*, die zum größten Teil im Kern vorgefunden wird.

Die für eine vollständige Glykolyse notwendigen Enzyme wurden alle im Zytosol lokalisiert. Von den Enzymen, bei denen mehrere Isoformen identifiziert und lokalisiert werden konnten, befindet sich wenigstens eine der beiden im Zytosol. Die *Enolase2*, die sich größtenteils im Kern befindet, wurde von anderen Arbeitsgruppen ausführlich beschrieben. Auch für die bradyzoiten-spezifische *Enolase1* ist die Lokalisierung im Kern eindeutig gezeigt worden (Ferguson *et al.*, 2002). Die Unterschiede zu der hier gezeigten zytosolischen Lokalisierung liegen in dem unspezifischen Promotor und dem falschen Stadium der Parasiten.

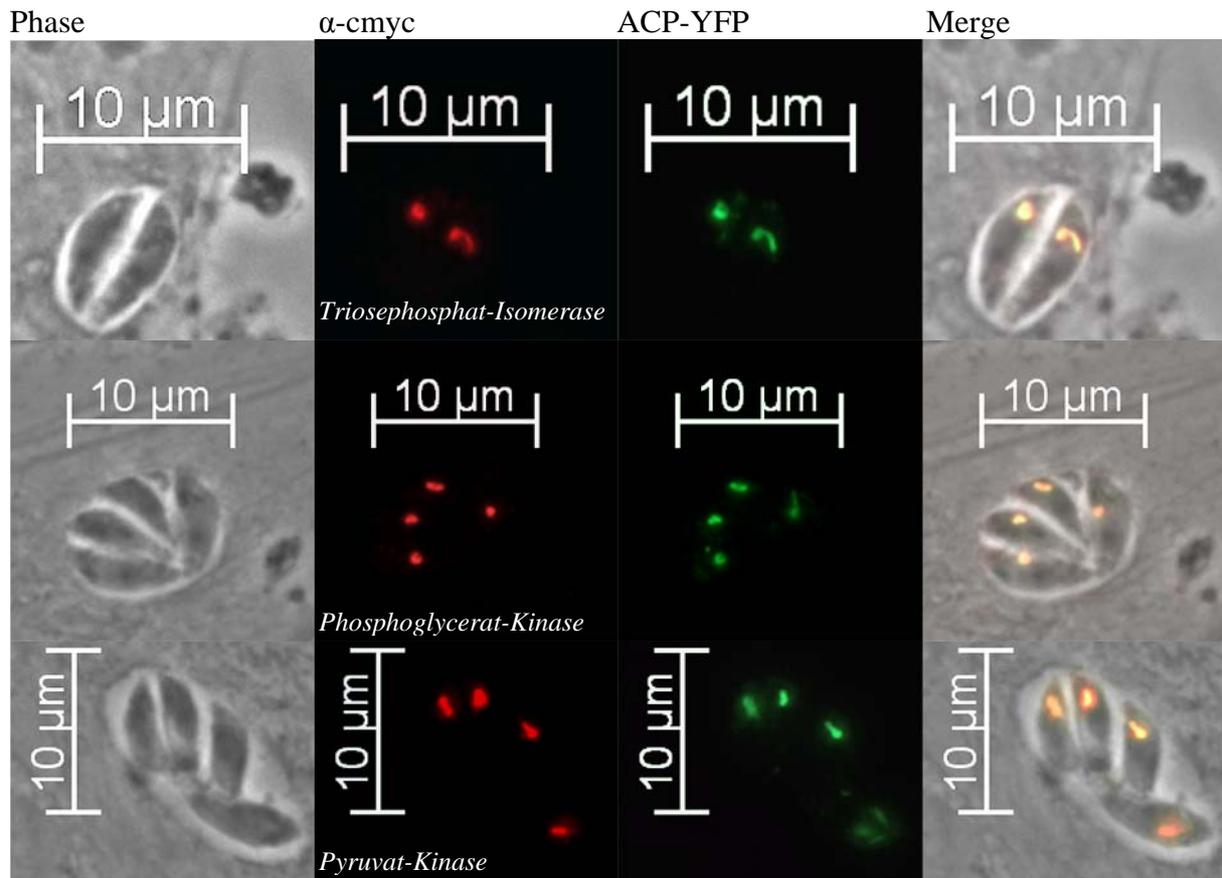


Abb. 5: Glykolytische Isoenzyme im Apicoplasten. Von oben nach unten sind die Lokalisationen der *Triosephosphat-Isomerase*, *Phosphoglycerat-Kinase* und *Pyruvat-Kinase* dargestellt. Als Markerenzym diente die plastidische Lokalisation des ACP Proteins, dessen Leserahmen mit einem Gelb-Fluoreszenzprotein fusioniert wurde (DeRocher *et al.*, 2000). Durch fehlende Filter am Mikroskop wird das Gelbe Fluoreszenzprotein (YFP) grün wieder gegeben. Diese Isoenzyme sind ausschließlich im Apicoplasten lokalisiert. Durch die Überlagerung der rot und grün Färbung ergibt sich im Merge eine gelb-orange Färbung.

Im Gegensatz zu den Isoformen der Enolase, die stadienspezifische reguliert sind, zeichnen sich die in dieser Arbeit identifizierten Isoenzyme durch eine Lokalisation in einem anderem Kompartiment des Parasiten, dem Apicoplasten, aus (s. Abb. 5).

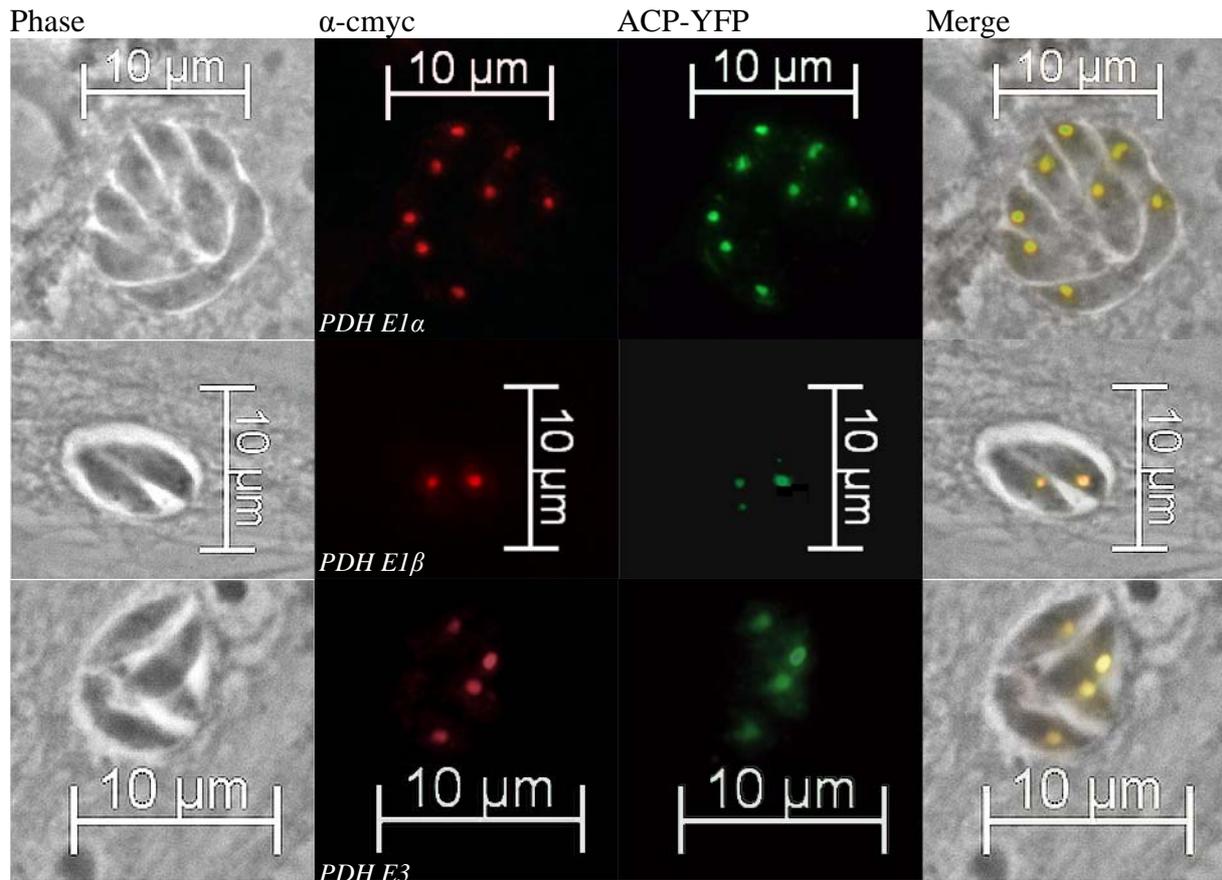


Abb. 6: Lokalisierung dreier Untereinheiten des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes*. Die drei Untereinheiten E1 α /E1 β und der E3 konnte mit den konstruierten Fusionsproteinen ausschließlich im Apicoplasten nachgewiesen werden. Von oben nach unten sind die Lokalisationen der E1 α /E1 β /E3 gezeigt. Als Marker für eine plastidische Lokalisierung diente wiederum ein Fusionsprotein bestehend aus dem ACP-Protein und einem Gelb-Floureszenzprotein.

Die Ausschließliche Lokalisierung des einzigen PDH-Komplexes im Apicoplasten ist in Abb. 6 dargestellt. Durch Co-Lokalisationen mit mitochondrialen Markern konnte eine teilweise Lokalisierung im Mitochondrium ausgeschlossen werden (ohne Abbildung).

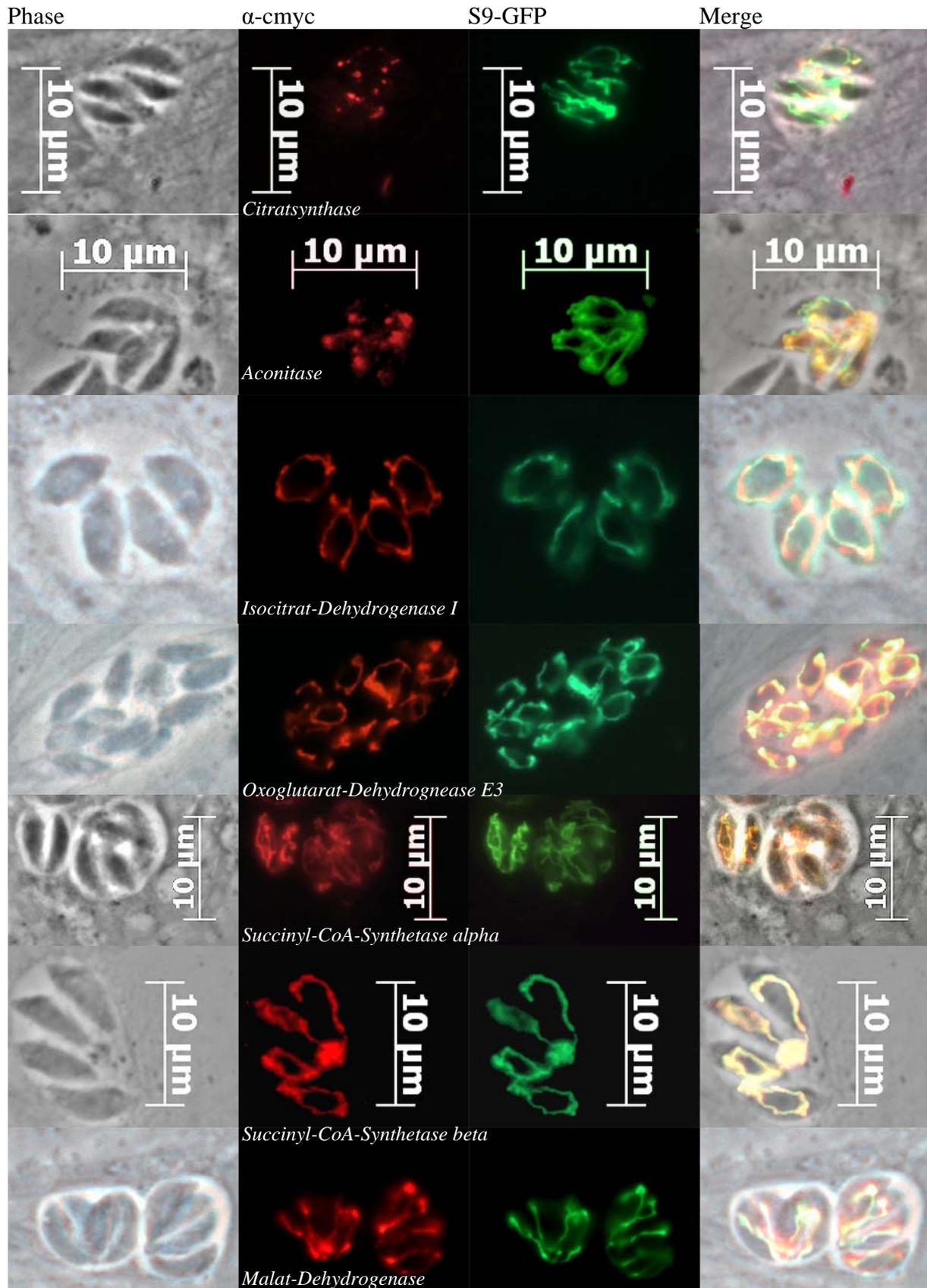


Abb. 7: Lokalisierung der Enzyme des TCA-Zyklus im Mitochondrium. Als Markerprotein für eine mitochondriale Lokalisierung diente ein Fusionsprotein bestehend aus einer S9-Spleißvariante und GFP. Von oben nach unten dargestellt: *Citratsynthase*, *Aconitase*, *Isocitrat-Dehydrogenase I*, *Oxoglutarat-Dehydrogenase E3*, *Succinyl-CoA-Synthetase alpha /beta* (ATP), *Malat-Dehydrogenase*

Bis auf die Isoform der Isocitrat-Dehydrogenase, die im Zytosol nachgewiesen werden konnte, sind sämtliche Enzyme des TCA-Zyklus im Mitochondrium lokalisiert worden (s. Abb. 7). Sowohl die *Citratsynthase*, als auch die *Aconitase* scheinen nicht im kompletten Mitochondrium lokalisiert, sondern auf definierte Regionen beschränkt zu sein.

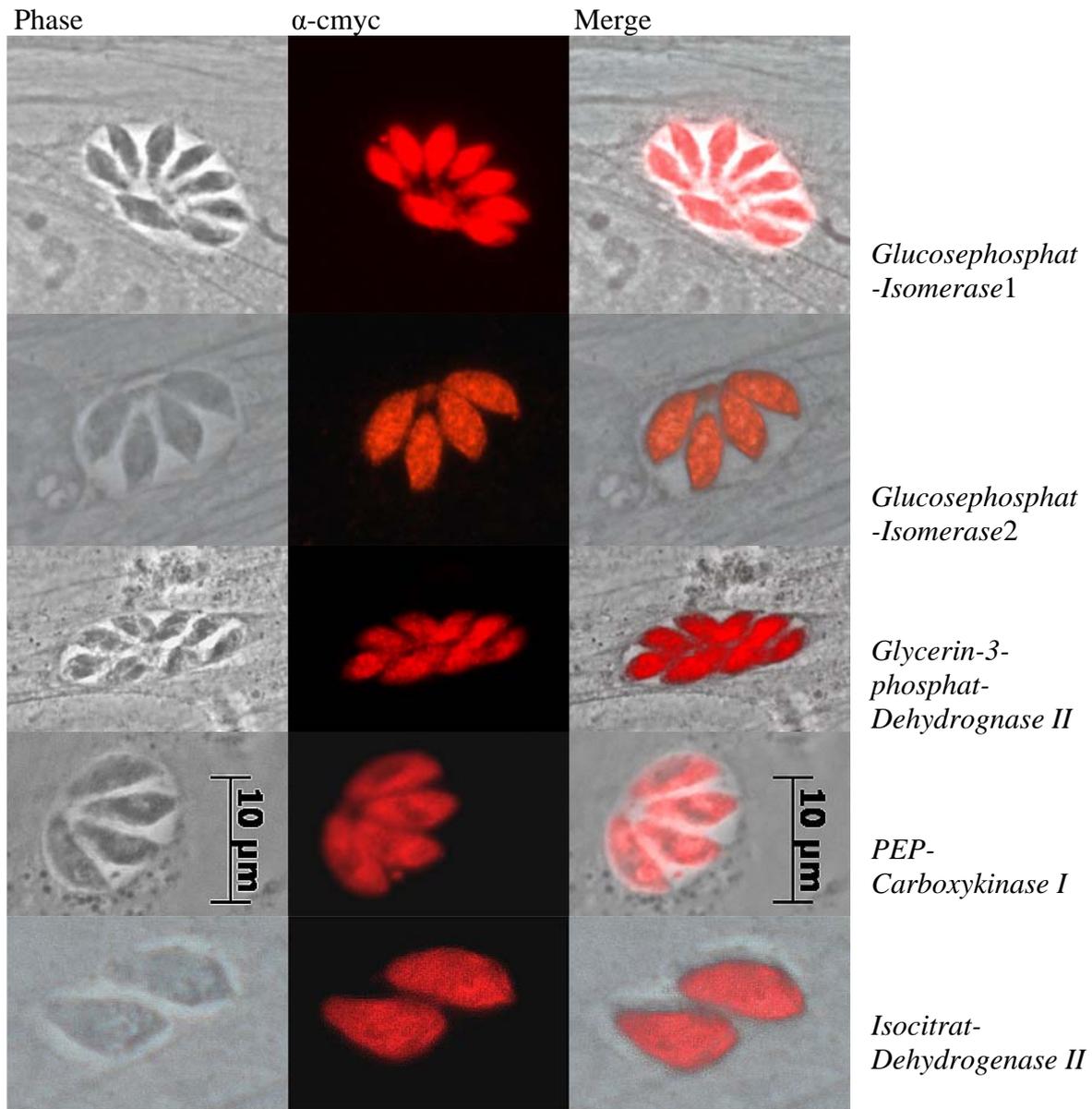


Abb. 8: Zytosolische Lokalisierung weiterer Enzyme die dem C-Stoffwechsel angegliedert sind.

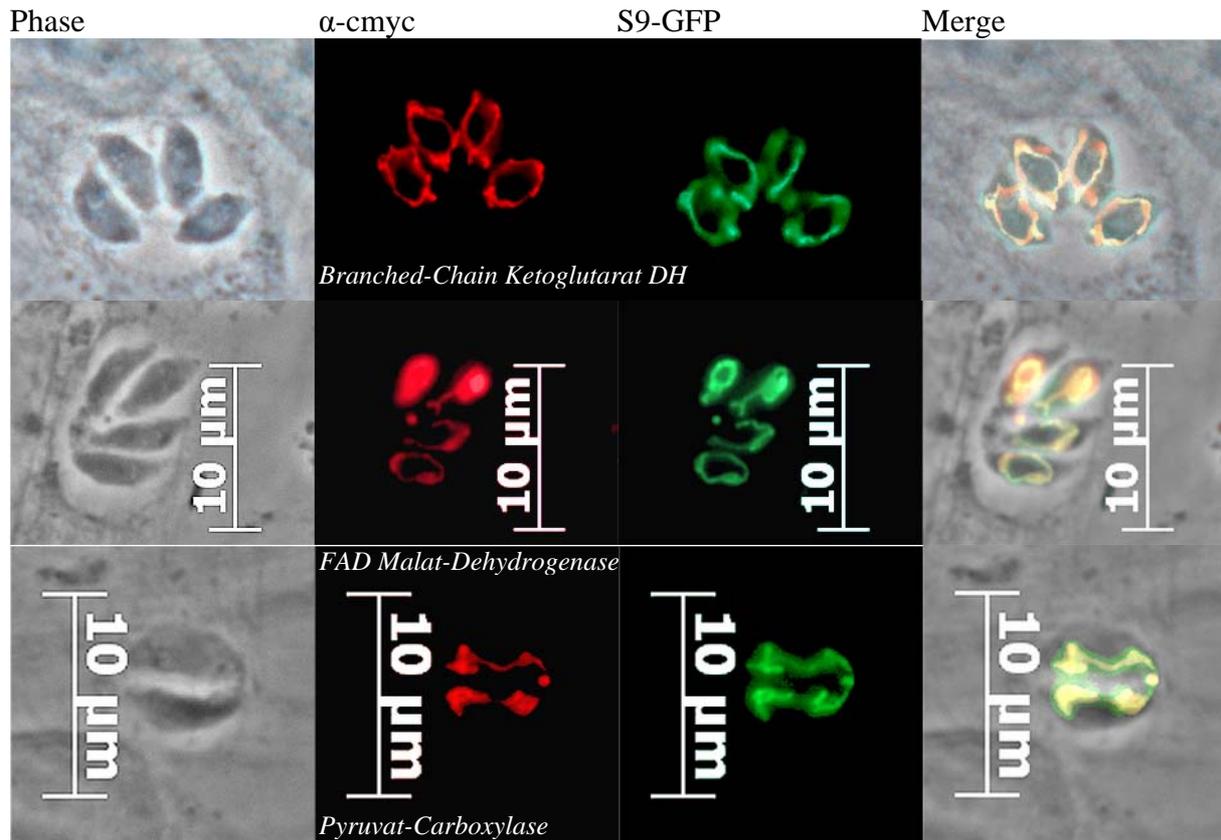


Abb. 9: Die Enzyme (von oben nach unten dargestellt) *Branched-Chain Ketoglutarat-Dehydrogenase E1*, *FAD Malat-Dehydrogenase* und *Pyruvat-Carboxylase* sind im Mitochondrium lokalisiert. Als Marker für eine mitochondriale Lokalisierung diente eine S9-Spleißvariante die mit einem GFP-Protein fusioniert wurde (DeRocher *et al.*, 2000).

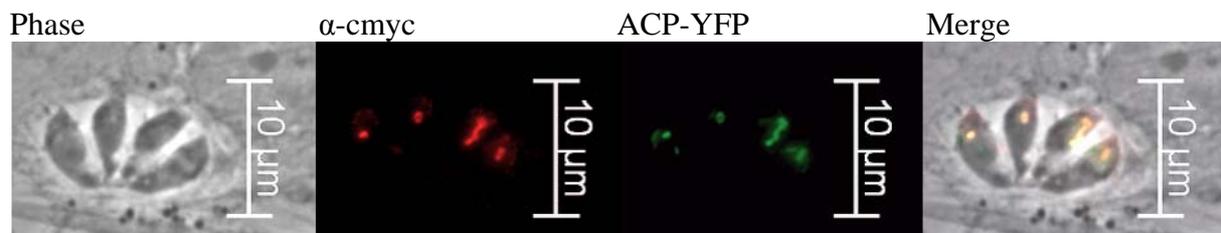


Abb. 10: Die Lokalisierung des *PEP-Translocator* im Apicoplasten. Als Marker für eine plastidische Lokalisierung diente wiederum ein Fusionsprotein bestehend aus dem ACP-Protein und einem Gelb-Floureszenzprotein.

Mit den Fusionsproteinen wurden sämtliche Enzyme für eine vollständige Glykolyse im Cytosol lokalisiert. Im Mitochondrium konnten ebenfalls alle für einen kompletten TCA-Zyklus benötigten Enzyme lokalisiert werden. Der *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* des Parasiten wurde ausschließlich im Apicoplasten vorgefunden. Ebenso wie die identifizierten Isoenzyme der TPI, PGK und PK die im Apicoplasten nach gewiesen werden konnten.

3.2.7 Herstellung von rekombinanten PDH Fragmenten

Um die ungewöhnliche Lokalisierung des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* zu bestätigen, sollten Antikörper gegen zwei Untereinheiten hergestellt werden. Zum einen gegen die bisher noch nicht lokalisierte E2 Untereinheit, sowie gegen die E1 β -Untereinheit. Zu diesem Zweck mussten Fragmente des Proteins rekombinant exprimiert, aufgereinigt und zusammen mit Adjuvantien für eine Immunisierung von Balb/c-Mäusen verwendet werden.

Ein Hydrophobizitäts-Blot der Aminosäuresequenz zeigte für die *PDH E1 beta*-Untereinheit eine Dreiteilung. Nach einem hydrophoben Bereich im N-terminalen Bereich, der das putative Transportsignal enthält, folgt ein hydrophiles Fragment, während der C-terminale Bereich wieder hydrophob ist. Für die Expression wurde das hydrophile Fragment von AA27 – AA198 ausgewählt.

Bei der Analyse der *PDH E2* Untereinheit ergab der Hydrophobizitäts-Blot ein uneinheitliches Bild. Der einzige längere hydrophile Bereich liegt im Zentrum des Enzyms (AA444 – AA669) und wurde daher für die Expression genutzt.

Die Klonierung, Expression und Aufreinigung der Proteine wurde anschließend zusammen mit einem Rotationsstudenten des Studiengangs „Molecular Biology“ in einem 6 wöchigen Praktikum durchgeführt.

3.2.8 Gewinnung von Antiserum gegen *PDH E1 beta* und *PDH E2*

Für die Gewinnung der Antiseren gegen die E1 beta und E2 Untereinheit wurden jeweils vier Balb/c-Mäuse mit den rekombinant hergestellten und aufgereinigten His-Tag Fusionsproteinen immunisiert. Den Mäusen wurde das Antigen, gemischt mit Adjuvans, je zur Hälfte subkutan und intramuskulär gespritzt. Nach jeweils 4 Wochen wurde mit Antigen geboostert, um nach insgesamt 12 Wochen die Mäuse auszubluten.

Die Überprüfung der erhaltenen rekombinanten Antiseren erfolgte mit einem Western-Blot, bei dem die aufgereinigten Fusionsproteine aufgetragen und mit den gewonnenen Maus-Seren untersucht wurden. Dabei zeigten alle 8 Seren die gewünschte Aktivität ohne eine starke Kreuzreaktion aufzuweisen. Daher war eine weitere Aufreinigung der Antiseren nicht notwendig.

3.2.9 Lokalisation von PDH-Untereinheiten mittels eines Immunfluoreszenztests

Um mit den Antiseren die Lokalisation des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* im Apicoplasten zu bestätigen, erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung bei einem RH-Stamm, der mit einem Markerplasmid transfiziert worden war.

Als Marker diente in diesem Fall die NADP-abhängige *Ferredoxin-Reduktase* (FNR), die im Apicoplasten zu finden ist (Seeber *et al.*, 2002), und an ein *Rot-Fluoreszierendes-Protein* (RFP) fusioniert wurde.

HFF-Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-Napf Schalen angezogen und, nachdem der Zellrasen konfluent war, mit den transfizierten Parasiten infiziert. 24 h nach Infektion erfolgte die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd in PBS, gefolgt von der Permeabilisierung der Zellen mit 0,25 % Triton X-100 in PBS. Als Erstantikörper wurden die erhaltenen Seren 1:250 in 1 % BSA / PBS eingesetzt und mit einem Cy2-Esel-anti-Maus (1:250 in 1 % BSA / PBS) die Lokalisierung sichtbar gemacht.

Mit den Antiseren ließ sich die Lokalisierung des PDH-Komplexes im Apicoplasten bestätigen, da beide Untereinheiten eindeutig und ausschließlich dort zu finden waren. Dies ist eine weitere Bestätigung für die Lokalisationsexperimente mit den myc-tag fusionierten Proteinen (s. Abb. 11).

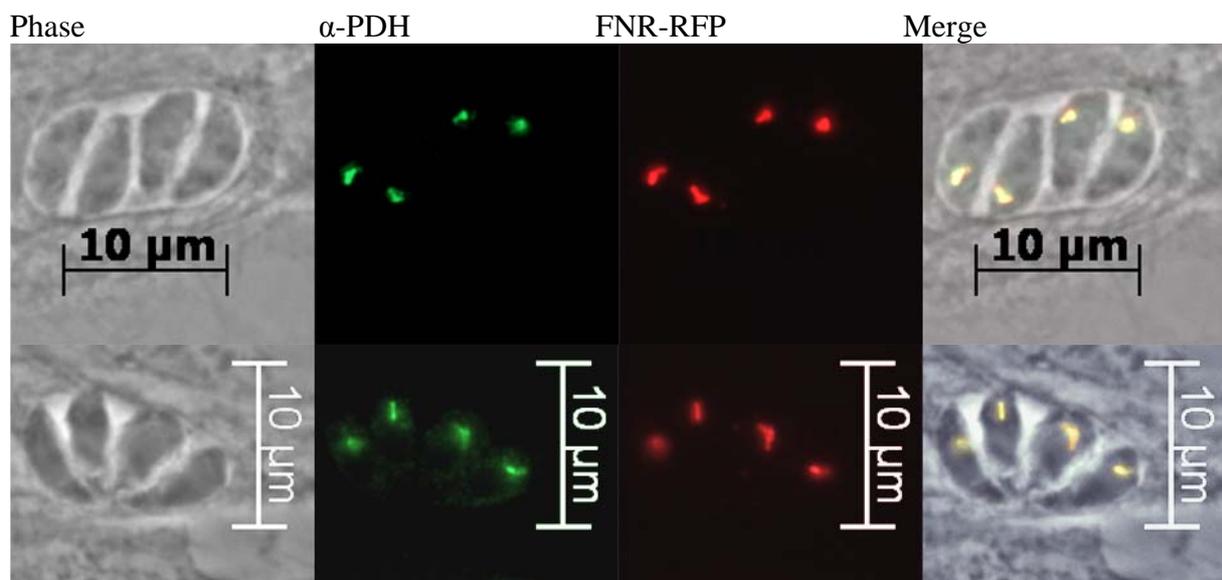


Abb. 11: Die Lokalisierung des PDH-Komplexes im Apicoplasten wurde durch das Antiserum gegen die E1 β -Untereinheit und die E2-Untereinheit bestätigt. Als Marker für die Apicoplasten-Lokalisierung diente die *Ferredoxin-Reduktase*, die an ein Rot-Fluoreszierendes-Protein gekoppelt wurde.

3.3 Genexpression während der Stadienkonversion

Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Enzyme der Glykolyse stadienspezifisch (Bradyzoiten vs Tachyzoiten) exprimiert werden. Von den beiden Isoformen der *Enolase* und *Lactat-Dehydrogenase* wird jeweils nur eine während des Tachy- bzw. Bradyzoitenstadium exprimiert. Um zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit beschriebenen Isoenzyme des C-Stoffwechsels ebenfalls stadienspezifisch exprimiert werden, wurden quantitative RT-PCRs durchgeführt.

3.3.1 Konstruktion eines Bradyzoiten cDNA-Pools

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde ein cDNA-Pool aus *in vitro* kultivierten Bradyzoiten hergestellt. Dafür wurde die gleiche RH-Variante wie unter 3.2.3 verwendet, die eine für diesen Genotyp untypische gute Differenzierungsfähigkeit besitzt.

Der Zellrasen wurde abgeschabt, zweimal durch eine Kanüle gepresst, um die Parasiten aus den Zellen zu befreien und nach einer differentiellen Zentrifugation von einem Grossteil an Zellresten getrennt. Die verbliebenen Zellen wurden durch Filtration von den Parasiten entfernt. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung, wie unter 2. beschrieben. Von einem RNA-Aliquotes erfolgte dann die cDNA-Synthese (s. 2.2.1.7 / 2.2.1.8), die mit einer LightCycler RT-PCR auf ihre Konzentration an Bradyzoiten spezifischer cDNA überprüft wurde. Mit den dafür genutzten Primern konnte die Expression des bradyzoiten-spezifischen Gens *bag1* als auch die von *β -tubulin*, welches in diesem Fall als Housekeeping-Gen diente, bestimmt werden. Nach Normalisierung mit *β -tubulin* konnte durch einen Vergleich der Expressionstärke von *bag1* auf die Konzentration der Bradyzoiten-cDNA geschlossen werden. Die Expression von *bag1* wird in Bradyzoiten im Vergleich zu Tachyzoiten ungefähr 500-fach hoch reguliert. Nur wenn auf diese Weise ein genügend großer Anteil an Bradyzoiten spezifischer cDNA nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Aufnahme der isolierten RNA in den erstellten Pool.

3.3.2 Real-time RT-PCR

Die Expressionstärke der identifizierten Gene des C-Metabolismus wurde auf mRNA-Ebene zwischen Tachyzoiten und Bradyzoiten verglichen. Mit der Real-time RT-PCR ist es möglich, die relative Expressionsstärke eines Gens in Bradyzoiten und Tachyzoiten zu vergleichen. Die ermittelte Expressionstärke von jedem Gen ist der Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Real-time RT-PCRs, jeweils als Doppelbestimmung. Die Normalisierung erfolgte mit dem konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gen *Actin*.

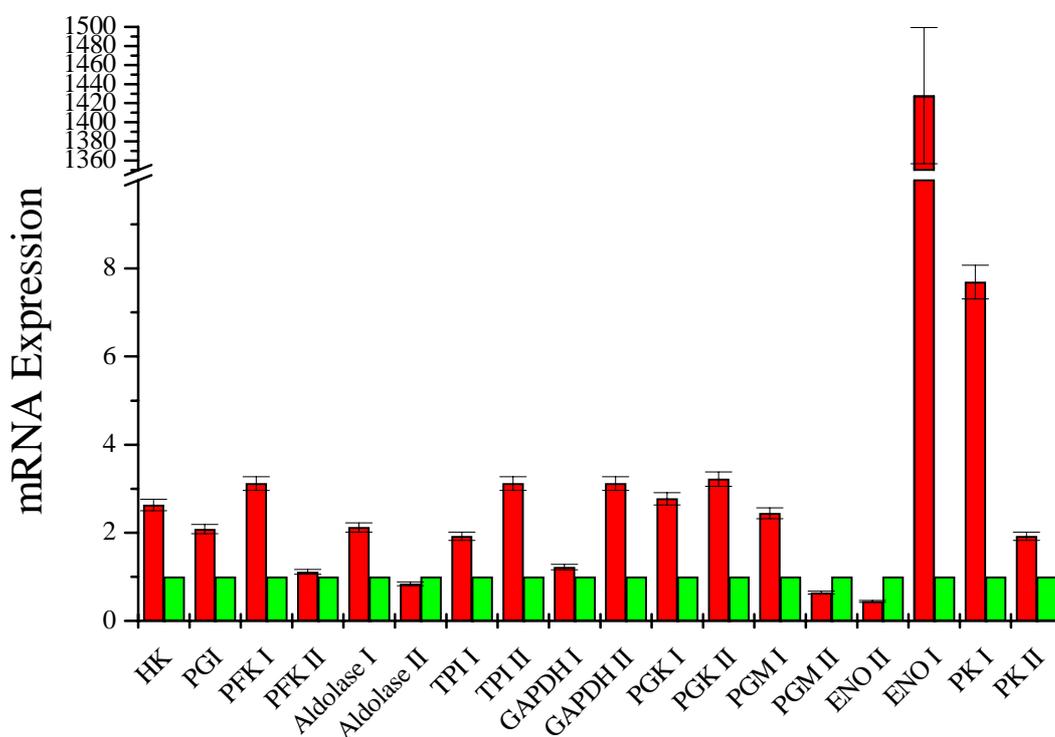


Abb. 12: LightCycler RT-PCR, in rot ist die Expression der einzelnen Gene im Bradyzoiten - und in grün im Tachyzoiten-Stadium dargestellt. Die Expression in den Tachyzoiten wurde gleich 1 gesetzt und sämtliche Werte mit *Actin* normalisiert. Im Vergleich zu den bekannten Bradyzoiten spezifischen Genen wie *Enolase 1* und *Pyruvat-Kinase 1* ist die Expression der untersuchten Gene nicht stadienspezifisch reguliert.

In Abb. 12 ist die Expression der glykolytischen Gene dargestellt, wobei die Expression im Tachyzoitenstadium gleich 1 gesetzt wurde. Als bradyzoitspezifische Expression wurde ein Unterschied von wenigstens Faktor 5 angenommen. Mit Ausnahme der bekannten *Enolase 1*, die als bradyzoitspezifisches Gen bekannt ist und in diesem Experiment als Vergleichskontrolle diente, und der *Pyruvat-Kinase I*, konnten keine signifikanten

Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Bradyzoiten und Tachyzoiten festgestellt werden.

Gleiches ist bei den einzelnen Komponenten des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* zu beobachten. Mit Ausnahme der E1 alpha Untereinheit, deren Expression 16fach hoch reguliert ist, konnte keine unterschiedliche Expression auf mRNA-Ebene beobachtet werden (s. Abb. 13).

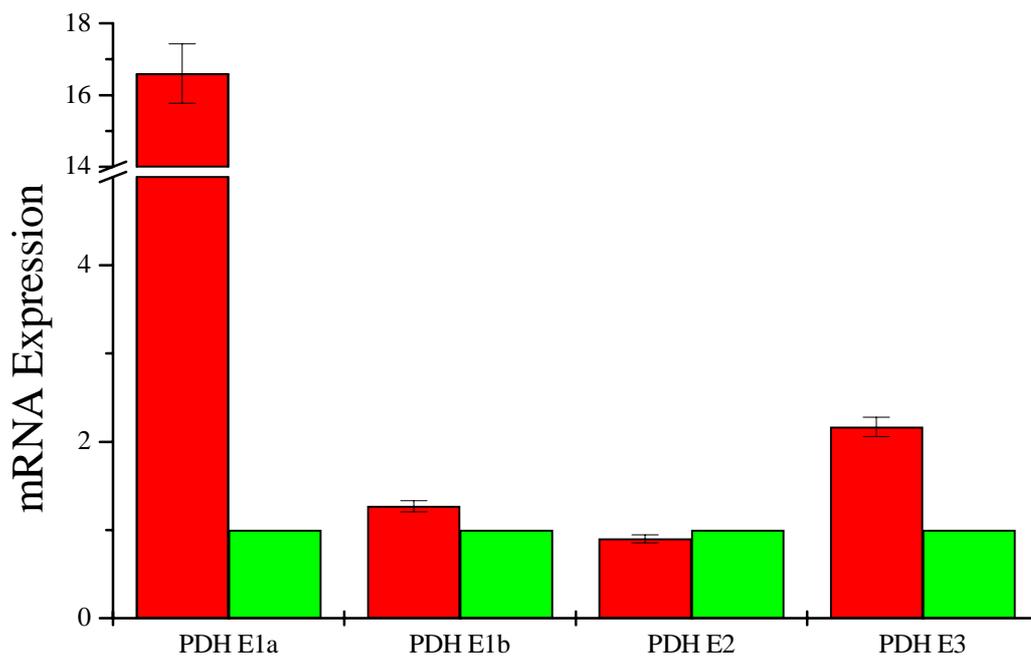


Abb. 13: LightCycler RT-PCR. Oben ist die Expression der Untereinheiten des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* dargestellt. Die Expression in Bradyzoiten ist in rot, die in Tachyzoiten grün dargestellt. Nur bei der E1 alpha-Untereinheit ist ein signifikanter Unterschied in der Expression im Bradyzoiten-Stadium feststellbar.

Auch bei den Genen des Zitronensäure-Zyklus, sowie den restlichen untersuchten Genen, konnte keine signifikante stadienspezifische Änderung des Expressionsverhalten nachgewiesen werden (s. Abb. 14/15).

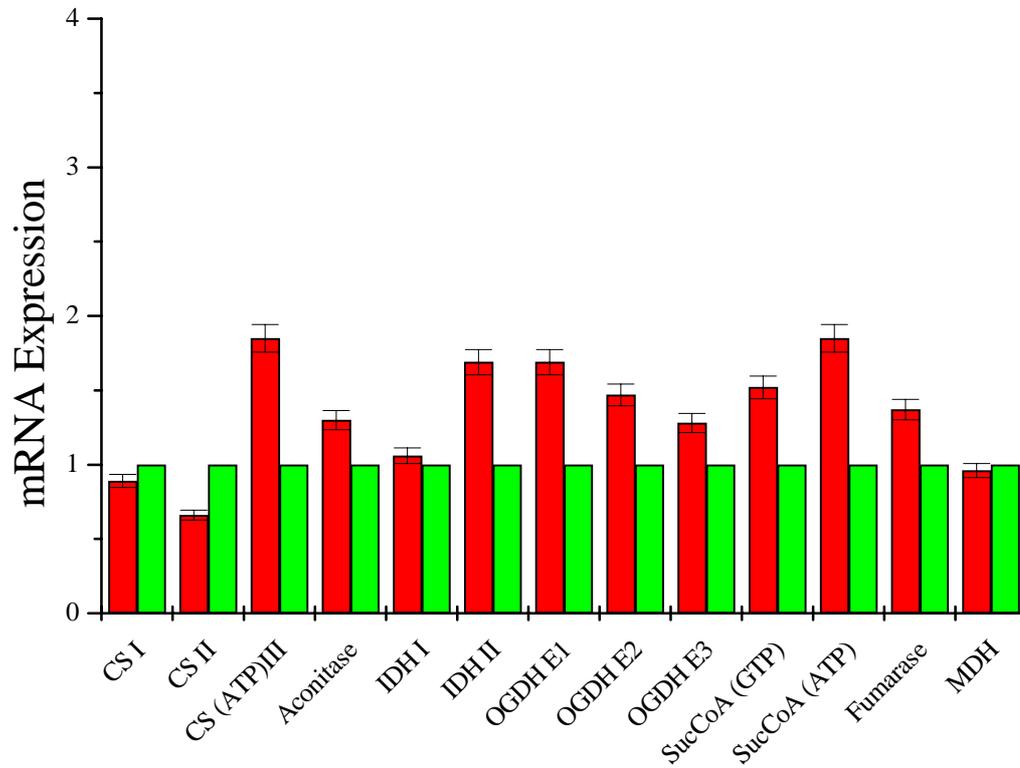


Abb. 14: LightCycler RT-PCR. Oben ist die Expression der Enzyme des Zitronensäure-Zyklus dargestellt. Die Expression in Bradyzoiten ist in rot, die in Tachyzoiten grün dargestellt. Einen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen dem Bradyzoiten- und Tachyzoiten-Stadium ist nicht feststellbar.

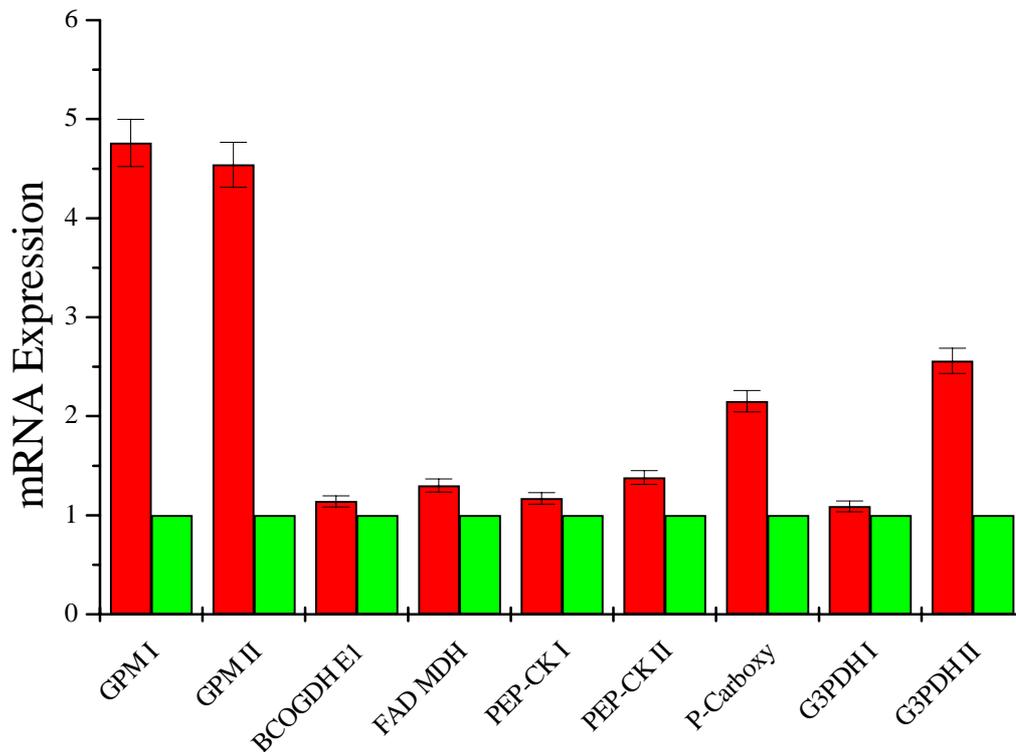


Abb. 15: Light Cycler RT-PCR. Die Expression der untersuchten Gene in Bradyzoiten ist in rot, die in Tachyzoiten grün dargestellt. Die Expression im Tachyzoite Stadium wurde gleich 1 gesetzt, und sämtliche Werte nach *Actin* normalisiert. Auch hier ist im Vergleich zu bekannten Bradyzoit spezifischen Markern kein stadienspezifischer Unterschied in der Expression nachweisbar. Die Expression der beiden Isoformen der *Glucosephosphat-Mutase* ist im Bradyzoiten-Stadium fast 5-fach höher als im Tachyzoiten-Stadium und daher gemäß der festgesetzten Definition im Grenzbereich.

3.4 Herstellung einer konditionalen Gendeletionsmutante

Zur genaueren Untersuchung der Funktion einzelner Gene des Kohlenstoff-Metabolismus sollte die Expression ausgewählter Proteine durch Disruption des offenen Leserahmens unterbunden werden. In *Toxoplasma gondii* nutzt man zu diesem Zweck die Fähigkeit des Parasiten zur homologen Rekombination aus, indem man auf einem Plasmid den offenen Leserahmen des Zielgens durch Integration eines Selektionsmarkers unterbricht und dieses „targeting construct“ in den Parasiten transfiziert (Donald *et al.*, 1994).

Da *Toxoplasma gondii* ein haploides Genom besitzt und durch *in silico* Analysen gezeigt werden konnte, dass die putativen Zielgene des C-Metabolismus nur einfach kodiert sind, musste für eine Generierung der Gendeletionsmutanten nur eine einfache Integration des Plasmides an seinen homologen Genlocus erreicht werden.

3.4.1 Strategie und Auswahl der Zielgene

Da es sich bei den möglichen Zielen um Gene des zentralen C-Metabolismus handelt, wurde vermutet, dass eine Deletion zu einem letalen Phänotyp führen könnte und daher eine erfolgreiche Disruption des Genlocus unter diesen Bedingungen nicht möglich ist. Um dieses Problem zu umgehen, sollte vor der Deletion des endogenen Gens eine zweite Kopie des Gens unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors in das Genom integriert werden, das gegebenenfalls die Funktion des Zielgens übernehmen kann (s. Abb. 16). Daher wurde für diese Experimente ebenfalls der RH Tati-Stamm verwendet, bei dem die Expression der zusätzlichen Kopie durch die Zugabe von Tetracyclin reguliert werden kann (Meisner *et al.*, 2002).

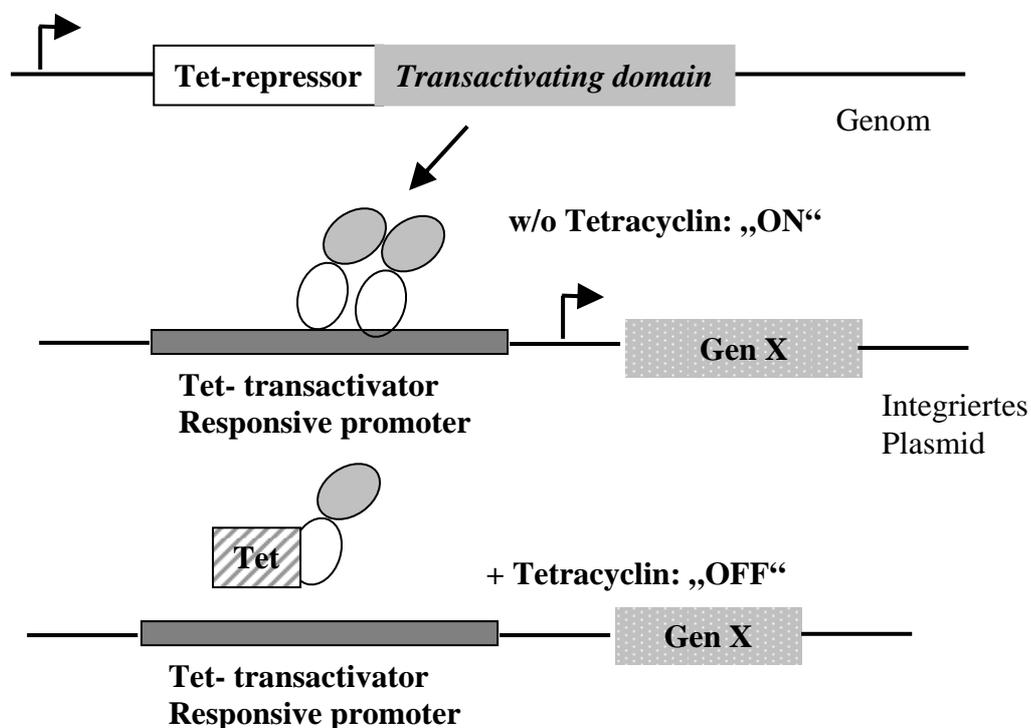


Abb.16: Schematische Darstellung des induzierbaren Promotors. Der Tati-Stamm exprimiert einen Tet-Repressor mit Transaktivator-Domäne. Das auf dem Plasmid codierte Gen befindet sich unter der Kontrolle eines Tetracyclin-transaktivator-abhängigen Promotors. Ohne Zugabe von Tetracyclin ist der Promotor aktiv und das Gen wird transkribiert, nach der Zugabe bindet Tetracyclin an den Repressor und verhindert so die Aktivierung des Promotors durch die Transaktivator-Domäne. Die Expression ist somit verhindert.

Für die Generierung der Knock-out-Mutante kamen daher nur die Gene in Frage, von denen der komplette offene Leserahmen bekannt und mit dem Tati-Plasmid in *Toxoplasma gondii* integrierbar war. Dies grenzte die Auswahl auf folgende Gene des Zitronensäurezyklus ein: *Isocitrat-Dehydrogenase II*, *Dihydrolipoly-Dehydrogenase*, *Succinyl-CoA-Synthetase alpha* (GTP), *Succinyl-CoA-Synthetase* (ATP), *Malat-Dehydrogenase*. Als weitere Kandidaten

wurden noch die *Pyruvat-Dehydrogenase E1 α / β* Untereinheiten und die *Branched-Chain α -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1* in die Versuche mit eingeschlossen.

Von jedem dieser Enzyme lagen stabile Transfektanten vor, bei denen die Expression der zusätzlichen Kopie sowie die Induzierbarkeit schon überprüft waren (s. 3.2.5 / 3.2.6).

3.4.2 Klonierung der „Targeting-Vektoren“

Um eine Gendeletion in das Genom von *Toxoplasma gondii* einzuführen, muß auf dem Plasmid, mit dem die homologe Rekombination erreicht werden soll, ein möglichst großer Bereich einer homologen Sequenz des Zielgens vorhanden sein. Des Weiteren muss auf dem Plasmid ein Selektionsmarker vorhanden sein, auf den nach einer erfolgreichen Integration selektioniert werden kann.

Für die Klonierung der Knock-out-Konstrukte sollte jeweils ein Fragment von mindestens 2 kb aus dem genomischen Locus mit Hilfe der PCR amplifiziert werden. Dabei wurde jeweils der Bereich beginnend vom Anfang des ersten Introns bis zum Ende des letzten Introns ausgewählt, oder wenn der Bereich nicht lang genug war, noch weitere Teilsequenzen des ersten Exons, allerdings ohne das Startcodon.

Für die *Pyruvat-Dehydrogenase E1 α* wurde eine Sequenz von 3200 bp ausgewählt, dem während der PCR die Schnittstellen *SacII* / *SpeI* angehängt wurden. Von der *Pyruvat-Dehydrogenase E1 β* Einheit wurde ein 2350 bp großer Bereich amplifiziert und *NotI* / *BamHI* Restriktionsschnittstellen integriert. Bei der *Isocitrat-Dehydrogenase II* konnte mit 1850 bp nur ein relativ kleiner Bereich amplifiziert werden, da das Enzym an sich nur über einen kurzen Leserahmen verfügt. In diesem Fall umfasste der Bereich den kompletten Leserahmen mit Ausnahme der ersten und letzten vier Nucleotide. Diese Sequenz wurde für eine Klonierung mit *SacII* / *BamHI* vorbereitet. Das amplifizierte Fragment von der *Dihydrolipoly-Dehydrogenase* wies eine Länge von 4550 bp auf, dem die Schnittstellen *SacI* / *BamHI* zugefügt wurden. Von der *Succinyl-CoA-Synthetase alpha* (GTP) wurde ebenfalls der komplette Leserahmen ohne die ersten 4 Nucleotide für die PCR verwendet, was zu einem Fragment von 3100 bp führte, dem die Restriktionsschnittstellen *SacII* / *SpeI* angehängt wurden. Die ausgewählte Sequenz für die *Malat-Dehydrogenase* hatte eine Größe von 2750 bp, und wurde mit den Schnittstellen für *Not I* / *BamHI* versehen. Der amplifizierte Bereich von der *Branched-Chain α -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1* wies eine Größe von 4438 bp auf, dem ebenfalls die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen *NotI* / *SpeI*

zugefügt worden waren. Die Amplifikation der genomischen Sequenz von *Succinyl-CoA-Synthetase* – ATP – war nicht erfolgreich.

Die amplifizierten Fragmente wurden zuerst in den pDrive-Vektor kloniert, aus dem sie dann durch einen Restriktionsdoppelverdau mit den jeweiligen Enzymen isoliert wurden.

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung der Knock-out Konstrukte wurde das Plasmid pSK-Tub/Cat/Sag verwendet. Dieses basiert auf dem pSK Bluescript (Stratagene) und trägt zusätzlich eine CAT-Expressionskassette, die als Selektionsmarker in *T. gondii* verwendet werden kann. Die Expressionskassette besteht aus der kodierenden Sequenz des *Chloramphenicoltransferase* (CAT) Gens, flankiert von einem 230 bp Fragment aus dem 5'UTR des *T. gondii* β -*tubulin* Gens und ca. 300 nt aus dem 3'UTR des *sag1* Gens von *Toxoplasma gondii* (s. Abb. 17).

In dieses Plasmid wurde über die entsprechenden Schnittstellen die amplifizierten Sequenzen einkloniert.

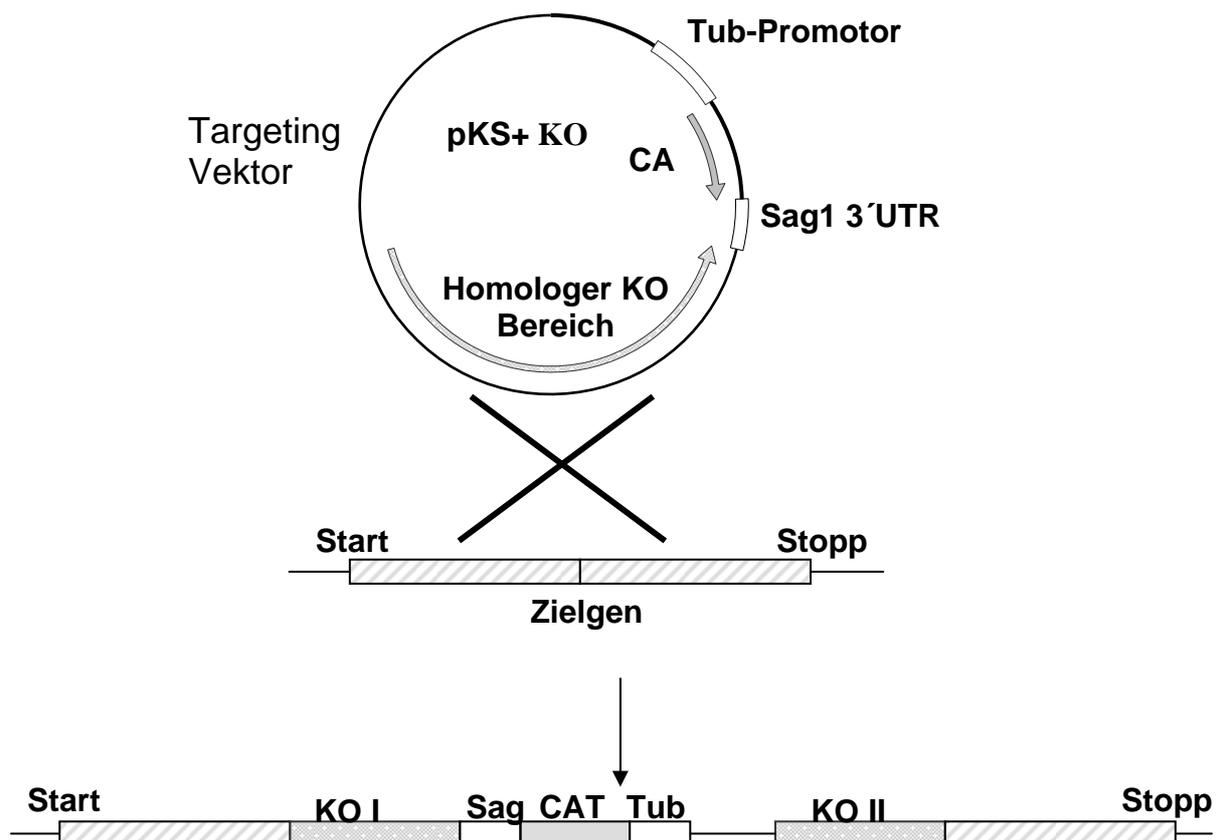


Abb. 17: Schematische Darstellung der homologen Rekombination

In Abb. 17 ist das Prinzip der homologen Rekombination zur Generierung des Knock-outs schematisch dargestellt, bei dem nach der Integration zwei funktionsunfähige Allele entstehen.

3.4.3 Transfektion und Selektion der Knock-out Parasiten

Zur Kontrolle der Selektion wurden nicht transfizierte Parasiten unter Selektionsdruck mitgeführt. Nach drei bis vier Passagen setzte die Selektion ein, und bis zu 85 % der transfizierten und 100 % der Kontrollparasiten wurden abgetötet.

Mit den überlebenden Parasiten erfolgten zwei weitere Passagen unter Zugabe von 20 μ M Chloramphenicol. Mit Hilfe der PCR wurden die Transfektanten anschließend auf eine erfolgreiche homologe Integration untersucht. Die dafür genutzten Primer lagen zum einen innerhalb der Selektionskassette bzw. im ursprünglichen Plasmidkonstrukt, und zum anderen entweder im 5' oder im 3' UTR des Gens, das ausgeschaltet werden sollte. Die Primer mussten außerhalb der kodierenden Sequenz liegen, da durch die Integration der zusätzlichen Kopie ansonsten weitere Primerbindestellen vorhanden gewesen wären. Da ein erstes Screening mit der kompletten Population zu keinem positiven Ergebnis führte, wurden die transfizierten Parasiten mit einer Verdünnungsreihe so auf 96 Napf-Schalen mit Flachboden vereinzelt, das sich am Ende jeweils 10 Parasiten pro Napf befanden. Unter dem Mikroskop konnte dies durch Auszählen der von den Parasiten gebildeten Plaques überprüft werden. Die so gewonnen kleinen Populationen wurden auf 12 Napf-Schalen überführt, und nachdem der Zellrasen komplett zerstört war, aufgeteilt. Eine Hälfte der Parasiten wurde weiter geführt, während von der zweiten Hälfte genomische DNA isoliert wurde. Diese DNA diente als Matrix für eine weitere PCR, bei der wiederum nach Klonen gesucht wurde, die das Plasmid homolog integriert hatten. Insgesamt wurden von jeder Transfektion jeweils 60 Populationen bestehend aus 10 Parasiten auf eine positive Integration überprüft. Auf diese Weise konnte eine Population identifiziert werden, bei der das „Targeting Construct“ sein Zielgen, die *Succinyl-CoA-Synthetase alpha*-Untereinheit, zerstört hat. Für die anderen Knock-out-Konstrukte zur Ausschaltung der *Isocitrat-Dehydrogenase II*, *Dihydrolipoly-Dehydrogenase*, *Malat-Dehydrogenase*, *Pyruvat-Dehydrogenase E1 α / β* -Untereinheiten und der *Branched-Chain α -Ketoglutarat-Dehydrogenase E1* konnte keine homologe Integration nachgewiesen werden. Diese Parasiten wurden folglich verworfen und im Folgenden nur noch mit dem identifizierten Knock-out der *Succinyl-CoA-Synthetase alpha* (SCSA) weiter gearbeitet.

3.4.4 Klonierung und Isolierung der Deletionsmutante

Da für das bisherige Screening nur Misch-Populationen benutzt wurden, musste als nächstes ein Einzelklon isoliert werden, bei dem der Genlocus der *Succinyl-CoA-Synthetase* getroffen worden war. Dafür wurden die Parasiten durch differenzielle Verdünnungsreihen kloniert und in HFF-haltigen Mikrotiter-Flachbodenplatten kultiviert.

Die Klone wurden auf 12-Napf Zellkulturschalen, die bereits einen konfluenten Zellrasen HFFs aufwiesen, überführt und diese so lange inkubiert, bis erste Plaques im Zellrasen zu erkennen waren. Die Parasiten wurden daraufhin zusammen mit den Wirtszellen abgeschabt, durch Kanülen gepresst und die eine Hälfte weiter passagiert, während aus der anderen Hälfte der Parasiten genomische DNA gewonnen wurde.

Die isolierte genomische DNA wurde wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben auf die homologe Integration des Targeting-Construct überprüft. Als Kontrolle diente eine PCR, die den offenen Leserahmen flankierte und bei einer nicht homologen Integration ein Produkt von 3870 bp Größe lieferte. Da eine nicht homologe Integration bei *Toxoplasma gondii* sehr viel häufiger als eine homologe Integration ist, war es notwendig eine große Anzahl von Einzelklonen zu screenen. Als Kontrolle für die PCR wurde für jede Reaktion gDNA von nicht transfizierten Parasiten mitgeführt. Auf diese Weise konnte ein positiver Einzelklon isoliert werden.

3.4.5 Nachweis der homologen Integration

Um zu beweisen, dass es sich (i) bei der isolierten Mutante tatsächlich um eine funktionelle TgSCSA alpha Deletionsmutante handelte, und (ii) sich das Targeting-Construct durch homologe Integration nur einmal in das Genom integriert hat, wurden zwei Nachweisverfahren angewandt.

Erstens wurde eine RT-PCR durchgeführt, bei der überprüft wurde, ob wirklich keine mRNA-Expression des Gens mehr stattfand. Zweitens wurden mehrer PCRs durchgeführt, bei denen die Primer sowohl den Genlocus flankierten, als auch innerhalb des Targeting-Constructs lagen. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend ansequenziert.

3.4.5.1 RT-PCR

Eine T25 Flasche, die konfluent mit HFF-Zellen bewachsen war, wurde mit der Deletionsmutante TgSCSA infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen abgeschabt, durch eine

Kanüle gepresst und die Parasiten von den restlichen Wirtszellen durch partielle Zentrifugation getrennt. Anschließend erfolgte eine RNA-Isolierung, gefolgt von der cDNA-Synthese. Als Kontrolle diente ein RH-Wildtyp Stamm, mit dem genauso verfahren wurde. Um auszuschließen, dass die amplifizierte DNA von der Expression der zusätzlich integrierten Kopie stammt, wurde der reverse Primer in den 3'UTR gelegt, der in der zusätzlichen Kopie nicht vorhanden war. Ein Vergleich des neuen RT-Primer mit den vorher für die LC RT-PCR genutzten zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Bei der Deletionsmutante konnte keine Expression des wt-Gens nachgewiesen werden, während bei der Kontrolle eine erwartete Bande von 340 bp auftrat. Die Expression der zusätzlichen Kopie konnte mit Hilfe eines weiteren Primerpaars und einer daraus resultierenden DNA-Bande von 750 bp nachgewiesen werden. Als Auftrags- und Normalisierungskontrolle, um vergleichbare Mengen aufzutragen, diente die Expression von *Actin* (Bande von 350 bp Größe; s. Abb. 18).

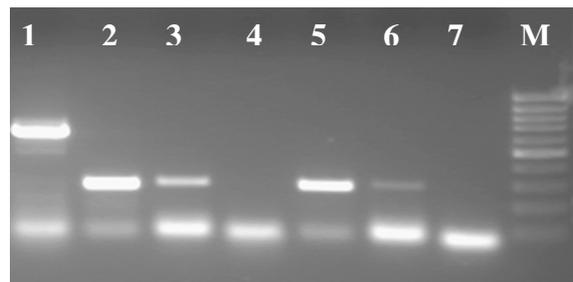


Abb. 18: RT-PCR zum Nachweis des zerstörten Genlocus. In den ersten drei Spuren ist cDNA des Ausgangsstammes als Matrize für die RT-PCR genutzt worden. In 1 ist die Expression des Original-Gens mit einem Primerpaar dessen reverse Primer im 3'UTR liegt, gezeigt (Bande bei 750 bp). 2 zeigt die Expression der zusätzlich integrierten Kopie der SCSA. In 3 ist als Kontrolle die Expression von *Actin* als Marker dargestellt. In den folgenden drei Spuren diente cDNA des konditionalen Knock-out als Matize. Spur 4 zeigt das Fehlen der Expression des Originalen Gens. In 5 ist wiederum die Expression der zusätzlichen Kopie gezeigt, und in Spur 6 die Expression von *Actin*. Spur 7 zeigt die Negativkontrolle mit RNA und *Actin* als Primer

3.4.5.2 PCR mit flankierenden Primern

An isolierter genomischer DNA von RH Tati und der Deletionsmutante wurden PCR-Reaktionen durchgeführt um die homologe Rekombination zu bestätigen. Die dafür verwendeten Primer waren im 5' und 3' UTR des offenen Leserahmens lokalisiert, sowie innerhalb des Plasmides. Diese Auswahl des Primer war notwendig, da der komplette Genlocus mit dem integrierten Plasmid eine Größe von 10,5 kb aufwies und daher mit einer PCR nicht komplett amplifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurden jeweils zwei Fragmente von 4 kb Größe für den 5' Bereich und von 3,5 kb Größe für den 3' Bereich des Integrationsortes gewählt.

Eine PCR mit nachfolgender Agarosegelelektrophorese ergab die erwarteten DNA-Bandengrößen beim Ausgangsstamm und der Mutante. Die erhaltenen DNA-Banden bei der Mutante wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und mit den PCR-Primern zum Sequenzieren gegeben. Damit konnte bestätigt werden, dass das amplifizierte Fragment dem Erwarteten entsprach und damit das Plasmid sich tatsächlich homolog integrierte. In der folgenden Abbildung ist das Schema der Integration, sowie das Screening, dargestellt (s. Abb. 19/20).

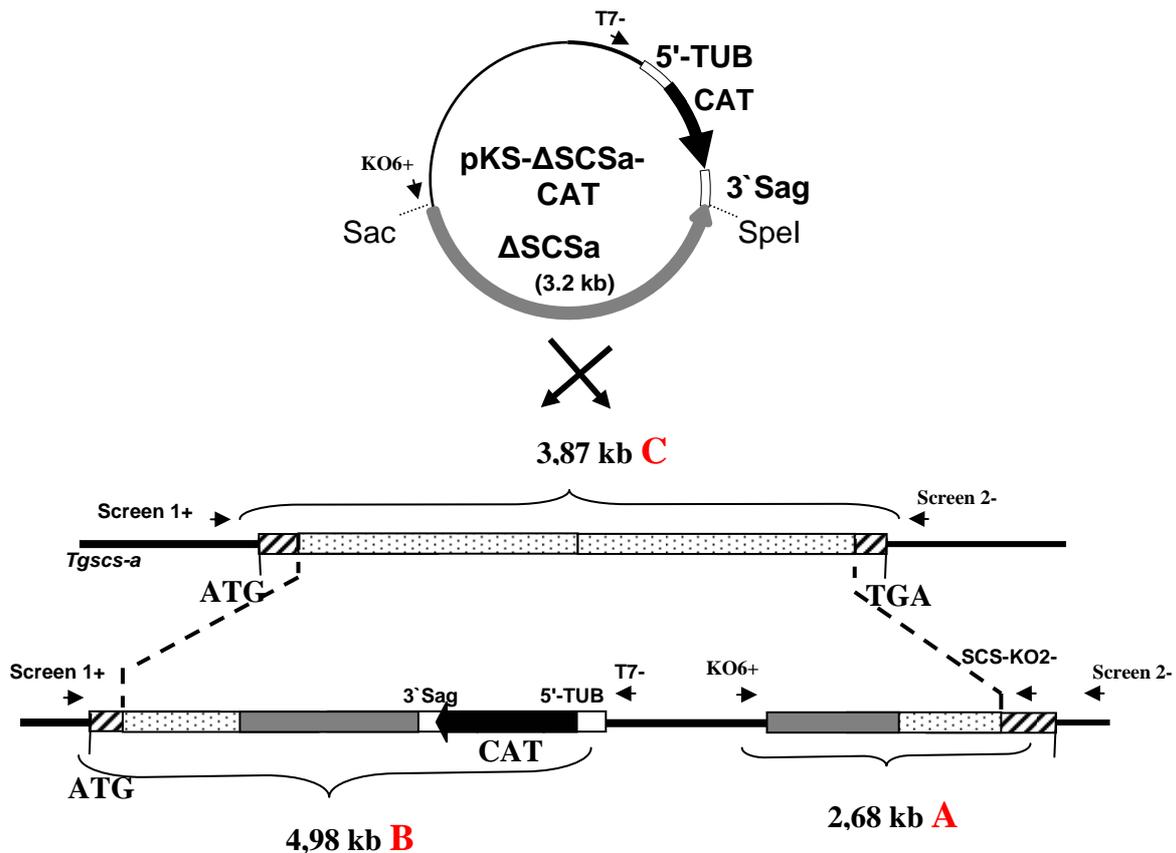


Abb. 19: Schematische Darstellung der homologen Integration des knock-out Plasmides pKS-ΔSCSa-Cat. Die angegebenen Fragmentgrößen wurden mit den entsprechenden Primern als Nachweis in der PCR genutzt.

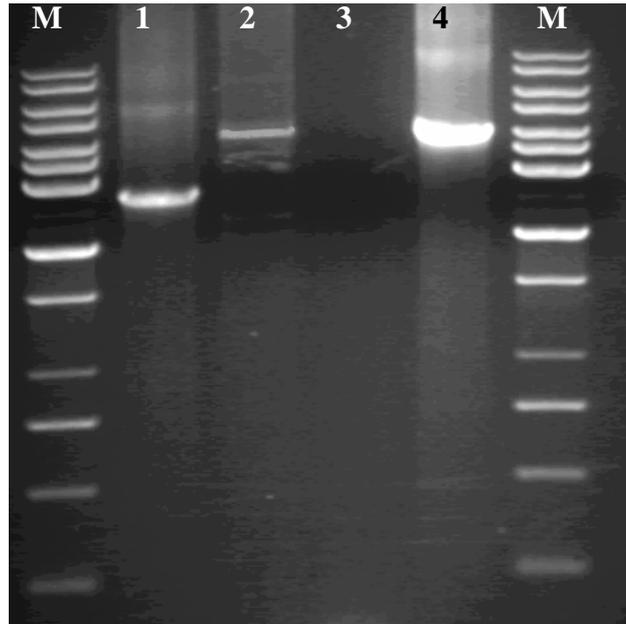


Abb. 20: PCR gDNA zur Verifizierung der homologen Integration von pKS- Δ SCSa-CAT. In Spur 1 wurde ein Primerpaar verwendet bei dem der „forward“ Primer im Übergang des Plasmidbackbones zum Insert liegt (KO6+) (s. Abb. 18 Bereich A) und der „reverse“ Primer in der codierenden Sequenz (SCS-KO2-). Das PCR-Produkt zeigte die erwartete Größe von 2686 bp. Für das Produkt in 2 wurde ein Primerpaar genutzt, dessen forward Primer im 5'UTR des genomischen Lokus liegt (Screen 1+), sowie der reverse Primer (T7) im Backbone des Plasmides (s. Abb. 18 Bereich B). Das PCR-Produkt zeigte die erwartete Größe von 4986 bp. In 3/4 wurde ein Primerpaar sowohl im 5' als auch 3' UTR (Screen 1+ / Screen 2-; s. Abb. 18 Bereich C) des genomischen Lokus benutzt. Damit sollte der intakte ORF amplifiziert werden. Dies war bei dem isolierten konditionellen Knock-out nicht möglich war, da durch die homologe Integration des Plasmides der zerstörte ORF eine Größe von 11kb aufwies. Als Kontrolle diente in der 5 Spur gDNA des Ausgangsstammes als Matrize. Hier war die Amplifikation des kompletten ORFs möglich, was eine erwartete Fragmentgröße von 3873 bp ergab.

3.4.6 Charakterisierung der Deletionsmutante

Grundvoraussetzung für eine Charakterisierung der konstruierten Deletionsmutante war die Fähigkeit, die unter dem induzierbaren Tetracyclin-Promotor stehende zweite Kopie durch die Zugabe von Anhydridtetracyclin, einem Tetracyclin Derivat, das dabei nicht toxisch auf den Parasiten wirkt, zu inhibieren.

Der Nachweis für eine erfolgreiche Inhibierung der Transkription der zusätzlichen Kopie erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden. Zum einen wurde mit einer RT-PCR auf RNA-Ebene die Expression untersucht, und zum anderen erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Erstantikörper gegen den myc-tag, der mit dem Leserahmen der zweiten Kopie fusioniert war.

Parasiten der Deletionsmutante wurden sowohl in T25 Flaschen mit konfluent gewachsenen HFF-Zellen als auch auf Deckgläschen mit HFF-Zellen in 24-Napfschalen angezogen, jeweils einmal mit und einmal ohne die Zugabe von ATc.

24h nach der Infektion wurden aus den Parasiten, die in den Zellkulturflaschen gewachsen waren, RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach der RT-PCR mit nachfolgender Agarosegelelektrophorese konnte noch eine schwache Bande in der erwarteten Größe (250 bp) nachgewiesen werden. Als Auftragskontrolle diente die Expression von Actin. Auch nach einer längeren Inkubation über 7 Tage mit ATC war weiterhin eine schwache Bande auf dem Agarosegel zu sehen. Die Inhibierung des Promotors scheint daher auf RNA-Ebene nicht vollständig zu sein (s. Abb. 21)

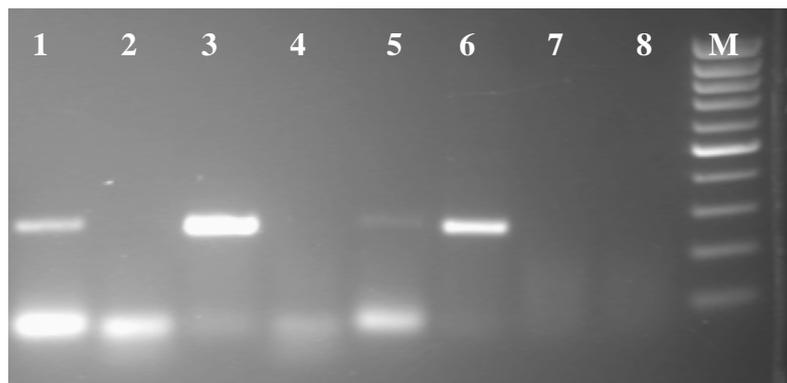


Abb. 21: RT-PCR zur Kontrolle der induzierten Inhibierung der zusätzlich integrierten Kopie der SCSA. Nachweis der Expressionsstärke der zusätzlichen Kopie unter der Kontrolle eines durch Tetrazyklin induzierbaren Promotors. In den ersten 3 Spuren wurde als Matrize für die RT-PCR cDNA von Parasiten die in Abwesenheit von ATc kultiviert wurden, während für die folgenden Spuren 4-6 cDNA von Parasiten isoliert wurde, die für mind. 2 Passagen mit Zugabe von ATc kultiviert wurden. In Spur 1 ist die Expression der zusätzlichen Kopie der SCSA aufgetragen, dabei wurde ein Primerpaar in der codierenden Sequenz gewählt. In Spur 3 ist die nicht vorhandene Expression der originalen genomischen Kopie gezeigt. Während in Spur 3 als Kontrolle die Expression des „Housekeeping gens“ GAPDH aufgetragen ist. Spur 4 zeigt die fehlende Expression der genomischen Kopie bei dem konditionalen Knock-out unter ATc Zugabe, während in 5 die Expression der zusätzlichen Kopie von SCSA gezeigt ist. Die Bindung des Tetrazyklins beträgt nicht 100%, so dass eine geringe Menge Resttranskript noch nachgewiesen werden konnte. In Spur 6 ist wiederum die Expression von GAPDH gezeigt. Als Kontrolle auf Verunreinigungen mit gDNA wurde RNA ebenfalls als Matrize für einen Nachweis auf GAPDH genutzt (Spur 7/8).

Die auf den Deckgläschen kultivierten Toxoplasmen wurden ebenfalls 24h nach der Infektion mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und die Zellen mit 0,25 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Markierung mit dem Erstantikörper gegen den myc-tag (1:250, Maus-anti-cmyc), der danach mit dem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper (1:500, Cy3 Esel-anti-Maus) nachgewiesen wurde. Auf Proteinebene konnte bei den mit ATc inkubierten Parasiten keine Expression des zweiten Gens mehr nachgewiesen werden, weder nach 24h noch nach 7 tägiger Zugabe. Bei den unbehandelten Parasiten dagegen konnte eine starke Fluoreszenz beobachtet werden (s. Abb. 22).

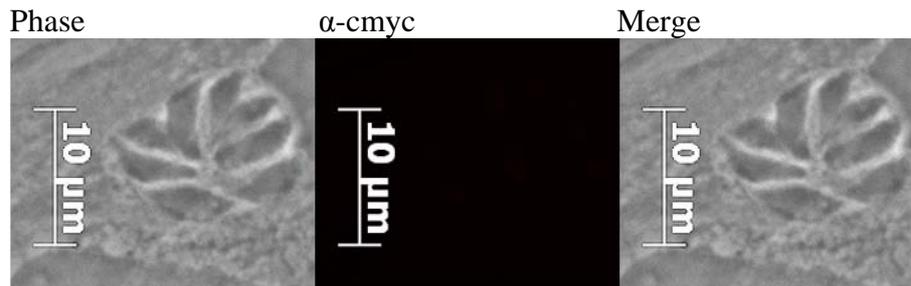


Abb. 22: Nachweis der Expression der zusätzlichen Kopie der SCSA auf Protein-Ebene nach ATc-Zugabe. Da auf RNA-Ebene noch eine geringe Expression feststellbar war, erfolgte der Nachweis der Expression auf Protein-Ebene mit einem Immunfluoreszenztest. Im IFT konnte keine Fluoreszenz und damit keine Expression nachgewiesen werden.

3.4.6.1 Wachstumsgeschwindigkeit in Tachyzoiten

Es sollte festgestellt werden ob die *Toxoplasma gondii Succinyl-CoA-Synthetase* alpha-Deletionsmutante durch die Disruption ihres Leserahmens in ihrer Vitalität beeinträchtigt wurde.

Ein konfluenten Zellrasen HFFs wurde auf Deckgläschen in 24-Napf-Zellkulturschalen mit Tachyzoiten des RH Tati-Ausgangsstammes, sowohl mit wie auch ohne ATc, der Mutante ohne ATc und mit ATc infiziert und für 24h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und unter dem Mikroskop die Anzahl der Toxoplasmen pro Vakuole ausgezählt. Insgesamt wurden viermal 750 Vakuolen mit mindestens zwei Parasiten für jeden Ansatz ausgezählt.

Mit der durchschnittlichen Anzahl an Parasiten zu einem bestimmten Zeitpunkt ergibt sich ein Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit und damit für die Vitalität der Parasiten. Dabei konnte kein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen dem RH Tati-Ausgangsstamm mit und ohne ATc-Zugabe festgestellt werden. Das Wachstumsverhalten der Deletionsmutante mit eingeschalteter zusätzlicher Kopie ist ähnlich dem des Ausgangsstammes. Ein signifikanter Unterschied dagegen wurde bei der Deletionsmutante mit ausgeschalteter zweiter Kopie sichtbar (s. Abb. 23). Die statistische Auswertung mit Hilfe des T-Tests ergab einen Wert von 0,0029, der damit deutlich unter dem Grenzwert von 0,005 liegt und daher ein Nachweis für einen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten des Parasiten darstellt.

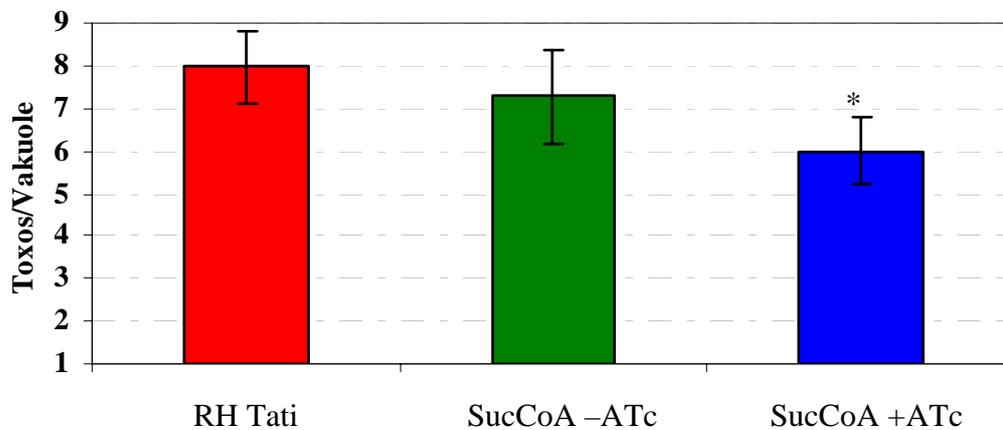


Abb. 23: Durchschnittliche Anzahl der Parasiten pro Vakuole 24h nach Infektion. Beim Ausgangsstamm (rot) sind durchschnittlich 8 Parasiten pro Vakuole vorhanden, während beim Knock-out ohne ATc Zugabe (grün) durchschnittlich 7,2 Parasiten zu finden sind. Nach Zugabe von ATc (blau) verringert sich das Wachstum auf 5,9 Parasiten pro Vakuole. Die angegebenen Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

3.4.6.2 Komplementierung mit externer Succinat Zugabe

Die Reaktion, die von der *Succinyl-CoA-Synthetase* gesteuert wird, wandelt Succinyl-CoA in Succinat um. Diese Reaktion ist in den meisten Fällen reversibel und wird von demselben Enzym katalysiert. Um herauszufinden, ob der Effekt auf das Wachstum von *Toxoplasma gondii* aufgehoben werden kann und um einen Hinweis auf die Richtung des Metabolitflusses zu bekommen, wurde dem Zellkulturmedium Succinat oder α -Ketoglutarat zugegeben. Da eine Zugabe von Succinyl-CoA nicht sinnvoll war, weil es wegen seiner Größe nicht über die verschiedenen Membranen der Wirtszelle und des Parasiten transportiert werden kann, wurde alternativ α -Ketoglutarat zugegeben, das aus der Reaktion vor der Umwandlung in Succinyl-CoA entsteht.

Ein konfluenter Zellrasen von HFFs wurde auf Deckgläschen in 24-Napf-Zellkulturschalen mit Tachyzoiten des RH Tati-Ausgangsstammes, der Mutante ohne ATc und der Mutante mit ATc infiziert. In jedes Medium wurden verschiedene Konzentrationen (2-20 μ M) von Succinat oder α -Ketoglutarat zugegeben. Als zusätzliche Kontrolle dienten nicht infizierte HFF-Zellen. Konzentrationen über 5 μ M führten zu einer Schädigung der Wirtszellen oder der Parasiten, so dass diese nicht ausgewertet werden konnten. Nach 24h wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und unter dem Mikroskop die Anzahl der Toxoplasmen pro Vakuole bestimmt. Insgesamt wurden viermal 250 Vakuolen gezählt.

Die Zugabe von α -Ketoglutarat hatte keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten, die Deletionsmutante wuchs weiterhin signifikant schlechter als der Ausgangsstamm oder mit eingeschalteter Kopie (ohne Abb.).

Die Zugabe von 2 μ M Succinat führte sowohl bei dem Ausgangsstamm als auch bei der Mutante mit angeschalteter Kopie zu einem signifikant gesteigerten Wachstum. Die durchschnittliche Anzahl von Parasiten pro Vakuole stieg von 8 auf 9,4 an. Bei der Mutante mit ausgeschalteter Kopie führte die Zugabe nicht nur zu einer Komplementation des Wachstumsverhalten auf den Wert des unbehandelten Ausgangstammes, sondern hier konnte ebenfalls eine durchschnittliche Parasitenzahl von 9 pro Vakuole bestimmt werden (s. Abb. 24).

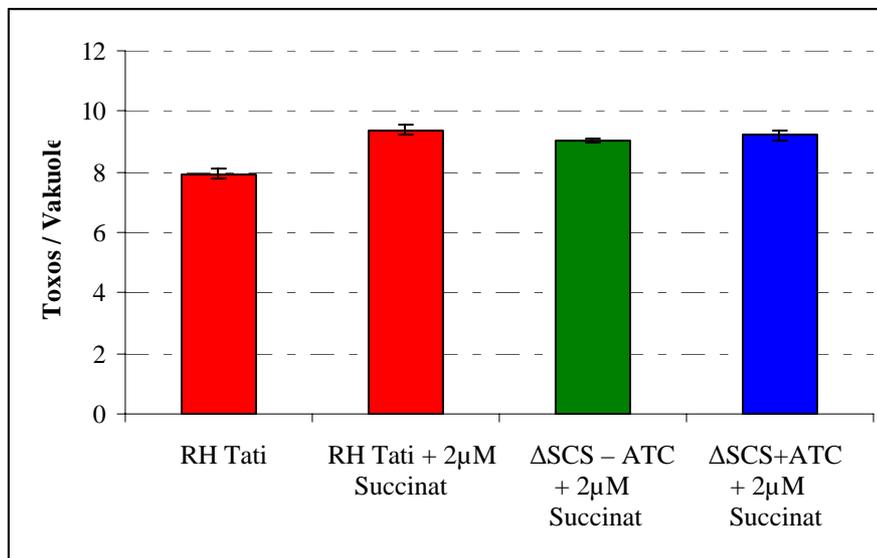


Abb. 24: Wachstumsgeschwindigkeit nach Zugabe von 2 μ M Succinat.

Mit der Zugabe von externem Succinat kann daher das Fehlen der *Succinyl-CoA-Synthetase* alpha-Untereinheit komplementiert werden.

4. Diskussion

Die zentralen Stoffwechselwege des C-Metabolismus sind die Glykolyse, der sich anschließende Zitronensäure-Zyklus, sowie die Verknüpfung dieser beiden Wege über den *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex*. Bei anaerob lebenden Organismen ist die Glykolyse die wesentliche Energiequelle, während für aerobe Eukaryoten der Abbau des Pyruvat im Zitronensäure-Zyklus der Hauptenergielieferant ist.

4.1 Der C-Metabolismus im Apicoplasten

Nach der Identifizierung eines durch sekundäre Endosymbiose entstandenen plastid-ähnlichen Organells bei Mitgliedern der Gattung Apicomplexa konnte seine Funktion bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Bisher konnten einige essenzielle Stoffwechselwege (u.a. Typ II Fettsäuresyntheseweg) im Apicoplasten lokalisiert werden.

Das mögliche Zusammenspiel dieser Synthesewege sowie der genaue Metabolitfluss ist nach wie vor ungeklärt.

4.1.1 Der PDH-Komplex und sein Einfluss auf den Metabolismus

In den meisten Eukaryoten spielt der *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* eine zentrale Rolle im mitochondrialen Metabolismus, indem er durch Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA die zytosolische Glykolyse mit dem TCA-Zyklus verbindet. In den Plastiden von Pflanzen und Algen wurde ein zusätzlicher PDH-Komplex identifiziert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass im Genom von *Toxoplasma gondii* nur Gene für einen PDH-Komplex codiert sind. Eine Ausnahme bildet die E3-Untereinheit, von der zwei Isoenzyme vorhanden sind. Sowohl mit den rPDH-spezifischen Antikörpern als auch mit PDH-Fusionsproteinen konnte in dieser Arbeit die Lokalisierung des PDH-Komplexes ausschließlich im Apicoplasten bestätigt werden. Im Mitochondrium ist bis auf die Isoform der E3-Untereinheit, die dort sowohl für den OGDH als auch den BCOGDH Komplex benötigt wird, keine weitere Untereinheit des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* vorhanden. Phylogenetisch gruppieren die mitochondrialen PDHs der Eukaryoten mit vergleichbaren Enzymen der α -Proteobakterien, während die plastidischen PDHs eher denen von Cyanobakterien gleichen (Schnarrenberger und Martin, 2002). Eine phylogenetische Analyse

der Proteine von *T. gondii* gruppierte die einzelnen Untereinheiten jeweils zu den homologen Enzymen von Cyanobakterien, wie es auch bei den plastidischen PDHs von Pflanzen und Algen gezeigt werden konnte.

Der *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* besteht aus drei Untereinheiten (E1 / E2 / E3), wobei die E1-Untereinheit noch in E1 α und E1 β unterteilt wird. Sie katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat, die E2-Untereinheit transferiert die Acetyl-Gruppe auf das Coenzym A, während die E3-Einheit für die Regenerierung der oxidierten Form des Liponamids verantwortlich ist, bei der NADH+H⁺ entsteht (s. Abb. 25). Die E3-Untereinheit der mitochondrialen PDH, die *Dihydrolipoyl-Dehydrogenase*, wird außerdem vom α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex und vom *Branched-chain Ketoglutarate-Komplex* genutzt.

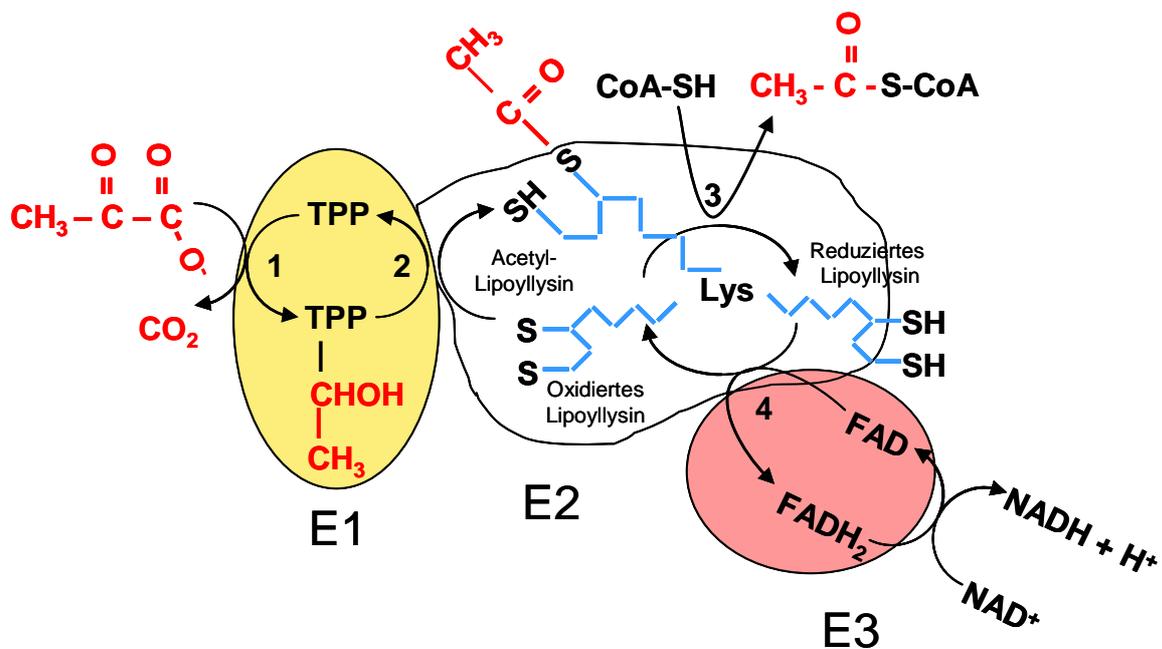


Abb. 25: Reaktionsschema des PDH-Komplexes. Der PDH-Komplex besteht aus drei Enzymen, der Pyruvat-Dehydrogenase (E1), Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2), Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3) sowie fünf Co-Enzymen, Thiaminpyrophosphat (TPP), Liponsäure und FAD als katalytische Co-Faktoren, zusätzlich CoA und NAD⁺ als stöchiometrische Faktoren. Die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA erfolgt in vier Schritten. Zunächst wird Pyruvat nach Bindung an TPP decarboxyliert. Dabei entsteht Hydroxyethylthiaminpyrophosphat. Im zweiten Schritt wird die Hydroxyethylgruppe zu einer Acetyl-Gruppe oxidiert und gleichzeitig auf Liponamid übertragen. Diese zwei Reaktionen werden von der E1-Untereinheit katalysiert. Drittens erfolgt die Übertragung der Acetyl-Gruppe des Acetyl-Liponamids auf Coenzym A durch die E2-Untereinheit, wobei Acetyl-CoA entsteht. Während des letzten Schrittes wird die oxidierte Form des Liponamids von der E3-Untereinheit regeneriert, wobei zwei Elektronen erst auf eine prosthetische FAD-Gruppe des Enzyms und anschließend auf NAD⁺ übertragen werden.

Die Bedeutung der plastidischen Lokalisation des PDH-Komplexes in *T. gondii* für den Metabolismus im Mitochondrium wird in späteren Kapiteln näher betrachtet.

Die Plastide von Pflanzen und Algen sind der Ort der *de novo*-Fettsäuresynthese, wobei das von dem plastidischen PDH-Komplex gebildete Acetyl-CoA für diesen Syntheseweg benötigt wird (Bao *et al.*, 2000; Ke *et al.*, 2000; Ohlrogge *et al.*, 2000; Rawsthorne, 2002). Das bei dieser Reaktion entstehende $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird als Reduktionsäquivalent ebenfalls bei der Fettsäuresynthese benötigt. Der in den Plastiden lokalisierte *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* ist daher ein essenzieller Bestandteil des dortigen Metabolismus.

Wie in pflanzlichen Chloroplasten liefert der PDH-Komplex im Apicoplasten von *T. gondii* mit dem Acetyl-CoA nicht nur das benötigte Ausgangsprodukt, sondern auch die erforderlichen Reduktionsäquivalente für die Fettsäuresynthese. Von dem im Apicoplasten lokalisierten Startenzym der Fettsäuresynthese, einer Isoform der *Acetyl-CoA-Carboxylase* (EC-Number 6.4.1.2; GenID 41.m00004) (Jelenska *et al.*, 2001), wird das gebildete Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA umgewandelt, wobei ATP und Bicarbonat als Co-Faktoren benötigt werden (s. Abb. 26).

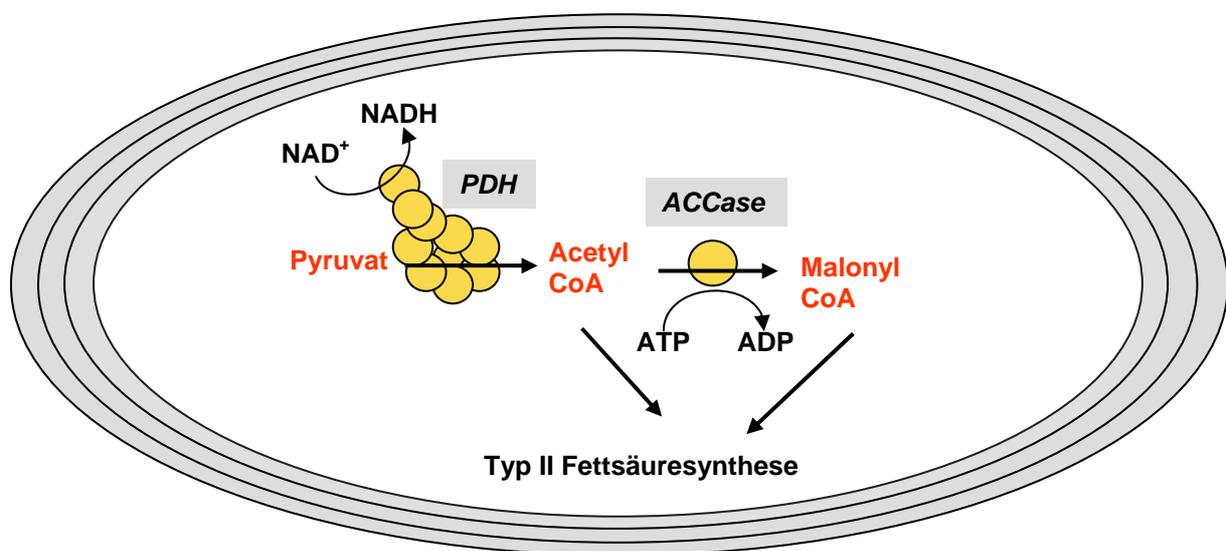


Abb. 26: Metabolitfluss im Apicoplasten von *T. gondii* I. Die in dieser Arbeit identifizierten und lokalisierten Enzyme des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* sowie die *Acetyl-CoA-Carboxylase* befinden sich im Apicoplasten. Die von diesen Enzymen gebildeten Produkte, sowie das NADH werden für die anschließende Fettsäuresynthese im Apicoplasten benötigt. PDH *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex*; ACCase *Acetyl-CoA-Carboxylase*

Der Ablauf der Typ II-Fettsäuresynthese ist in *Plasmodium falciparum* nahezu komplett aufgeklärt worden und wird im Folgenden genauer erläutert. In *Toxoplasma gondii* konnten ebenfalls einige der dafür notwendigen Enzyme identifiziert und im Apicoplasten lokalisiert

werden, allerdings noch nicht alle. Trotzdem ist davon auszugehen, dass *Toxoplasma gondii* ebenfalls über einen kompletten Typ II Fettsäure-Biosyntheseweg im Apicoplasten verfügt.

Der einzige *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* von Plasmodium ist ebenfalls ausschließlich im Apicoplasten lokalisiert und erfüllt dort die gleiche Aufgabe, wie sie in dieser Arbeit für *Toxoplasma gondii* beschrieben wurde (Foth *et al.*, 2005), nämlich die Bereitstellung von Acetyl-CoA und Reduktionsäquivalenten für die Fettsäuresynthese. Acetyl-CoA wird von der ACCase unter Verbrauch von ATP zu Malonyl-CoA carboxyliert, dem Ausgangspunkt für die Fettsäuresynthese. Die Umwandlung von Malonyl-CoA in Malonyl-ACP erfolgt durch die *Malonyl-CoA-Transacetylase* (FabD; EC-Nr. 2.3.1.39). Die *β -Ketoacyl-ACP-Synthase III* (FabH; EC-Nr.2.3.1.180) katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA mit dem Malonyl-ACP zu β -Ketoacyl-ACP. Diese Reaktion ist durch die Freisetzung von CO₂ irreversibel. Das gebildete Acetoacetat bleibt als Thioester an ACP gebunden und wird unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten (NADH) zu β -D-Hydroxyacyl-ACP reduziert. Diese Reaktion wird von der *β -Ketoacyl-ACP-Reduktase* (FabG; EC-Nr. 1.1.1.100) reguliert. Die folgende Dehydrierung durch die *β -Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase* (FabZ; EC-Nr. 4.2.1.58), bei der trans- Δ^2 -Enoyl-ACP entsteht, konnte für *Toxoplasma gondii* noch nicht bestätigt werden, da dieses Enzym bisher nicht identifiziert wurde. Abschließend wird die nach der Wasserabspaltung entstandene Kohlenstoffdoppelbindung durch die Enoyl-ACP-Reduktase (FabI; EC-Nr. 1.3.1.9), unter Verbrauch von NADPH, zu Acyl-ACP reduziert. Um die gebildete Fettsäure zu verlängern, wird sie zunächst auf ein anderes ACP übertragen. Die Kondensation dieses Acyl-ACP mit einem neu gebildeten Malonyl-ACP wird durch die *β -Ketoacyl-ACP-Synthetase I/II* (FabB/F; EC-Nr. 2.3.1.41) katalysiert. Dieses Enzym ermöglicht die Bildung von Fettsäuren mit einer Kettenlänge bis C₁₈ (s. Abb. 27).

Die in Chloroplasten von Pflanzen gefundene *Acetyl-CoA Synthetase* (EC-Nr.: 6.2.1.13), die in der Fettsäuresynthese eine wesentlich wichtigere Rolle für die Bereitstellung von Acetyl-CoA als der plastidische PDH-Komplex spielt, ist sowohl bei Plasmodium als auch bei Toxoplasma identifiziert worden. Allerdings konnten keine Importsequenzen für den Apicoplasten gefunden werden, weshalb auf eine zytosolische Lokalisation dieses Enzyms geschlossen wurde (Gornicki 2003). Sie ist daher für die Fettsäuresynthese im Apicoplasten von keiner Bedeutung. Gestützt wird dies durch die Entdeckung, dass Pyruvat eine wesentlich wichtigere Rolle als Acetat für den Stoffwechsel im Apicoplasten von *Plasmodium* ssp. spielt (Gornick 2003). Der PDH-Komplex ist im Apicoplasten folglich die einzige Quelle für Acetyl-CoA.

4.1.2 Der C₃ – Metabolismus im Apicoplasten von *T. gondii*

Im Genom von *Toxoplasma* wurden in dieser Arbeit Isoformen von diversen Enzymen der Glykolyse identifiziert. Von der *Triosephosphatisomerase*, *Phosphoglycerat-Kinase* sowie der *Pyruvat-Kinase* konnte die subzelluläre Lokalisierung dieser Isoenzyme im Apicoplasten mit Hilfe entsprechender Fusionsproteine gezeigt werden. Desweiteren wurde ein für den Transport von C₃-Körpern über die vier Membranen des Apicoplasten benötigter Translocator im Genom identifiziert und die Lokalisation mittels Fusionsproteinen bestätigt.

Mit diesen experimentell bestätigten Lokalisationen, sowie durch eigene *in silico*-Analysen und bisher publizierten Lokalisationen von Enzymen des C-Stoffwechselweges im Apicoplasten lassen sich verschiedene Modelle von Biosynthesewegen im Apicoplasten entwickeln.

Ein Weg für die Bereitstellung von benötigten C₃-Körpern für im Apicoplasten angesiedelte Synthesewege erfolgt über den Import von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) über den oben erwähnten Translocator. Das DHAP kann anschließend für verschiedenste Folgereaktionen genutzt werden.

Ein möglicher Stoffwechselweg, für den es genutzt werden kann, ist die Synthese von Komponenten biologischer Membranen. Dabei dient das DHAP als Substrat für eine, nach *in silico*-Analysen im Apicoplast lokalisierte Isoform der *Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase*, die daraus unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten Glycerin-3-phosphat herstellt. Dieses Glycerin-3-phosphat wird für die Synthese von Phosphoglyceriden benötigt (s. Abb. 27). Die nachfolgenden Schritte bis zur Synthese von Phosphatidat (Diacylglycerin-3-phosphat) finden ebenfalls im Apicoplasten statt. Dabei wird Glycerin-3-phosphat von der *Glycerol-phosphat-acyltransferase* (EC-Nummer: 2.3.1.15) in Lysophosphatidat überführt und nach einer weiteren Acylierung durch die *2-Lysophosphatidat-acyltransferase* (EC-Nummer: 2.3.1.51) Phosphatidat synthetisiert (Bisanz *et al.*, 2006). Dieses kann anschließend für weitere Syntheseschritte genutzt werden, bei dem entweder Triacylglycerine oder Phosphoglyceride entstehen. Allerdings finden diese Reaktionen nicht mehr im Apicoplasten sondern in anderen Kompartimenten des Parasiten statt (Ralph *et al.*, 2004).

Das DHAP wird auch noch für weitere wichtige metabolische Prozesse benötigt. Durch die in dieser Arbeit im Apicoplasten lokalisierte Isoform der *Triosephosphatisomerase* wird aus Dihydroxyacetonphosphat durch eine Isomerisierung Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) hergestellt.

Das wiederum kann zum einen weiter für die Isoprenoid-Biosynthese genutzt werden. Dieser Syntheseweg zeichnet sich dadurch aus, dass es sich nicht um den bei Eukaryoten üblichen Mevalonat-abhängigen Stoffwechselweg handelt. Die Synthese des Isopentenyl erfolgt aus Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat, das von der oben erwähnten Isoform der *Pyruvat-Kinase* zur Verfügung gestellt wird. Dieser Mevalonat-unabhängige Weg war bisher nur bei Pflanzen, Algen und Bakterien bekannt, und wurde für Protozoen erstmals bei *Plasmodium* beschrieben (Jomaa *et al.*, 1999). Der erste Schritt wird von der *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat-synthase* (DXS) synthetisiert, bei der Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat fusioniert werden (s. Abb. 27) und am Ende Isopentenyl-Pyrophosphat entsteht. Ein Grossteil der benötigten Enzyme dieses Stoffwechselweges konnten bei *Toxoplasma gondii* identifiziert werden und zeigten in *in silico*-Analysen die für eine Lokalisation im Apicoplasten notwendigen Signalpeptide.

Die Pyruvat-Kinase liefert nicht nur das benötigte Substrat für die Isoprenoid-Biosynthese, sondern auch für den PDH-Komplex. Das aus der Umwandlung von Phosphoenolpyruvat (PEP) in Pyruvat gebildete ATP wird wiederum für die Fettsäuresynthese benötigt. Der identifizierte Translocator scheint der einzige vorhandene Transporter zu sein, der C₃-Körper über die 4 Membranen des Apicoplasten transportieren kann. Daher wird vermutet, dass er im Gegensatz zu bekannten plastidischen Translocatoren nicht substratspezifisch ist, sondern ausschließlich phosphorylierte C₃-Körper, und somit sowohl PEP als auch Dihydroxyacetonphosphat, im Austausch gegen andere Substrate oder organisches Phosphat für den Apicoplasten bereitstellt.

Zum anderen wird GA3P durch die Isoform der *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* in 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3 BPG) umgewandelt. Bei dieser Redox-Reaktion entsteht mit NADH + H⁺ ein weiteres Reduktionsäquivalent. 1,3-BPG könnte anschließend durch den Translocator wieder aus dem Apicoplasten heraustransportiert und im Zytosol in die Glykolyse eingespeist werden, wie es für *Plasmodium* postuliert wurde (Ralph *et al.*, 2004). Das würde bedeuten, dass die Umwandlung von GA3P in 1,3-BPG nur der Generierung von Reduktionsäquivalenten dient. Um diese Hypothese zu prüfen, müsste allerdings die Funktion des Translocators näher charakterisiert werden.

Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die Isoform der *Phosphoglycerat-Kinase* die Übertragung einer Phosphorylgruppe vom Acylphosphat des 1,3-BPG auf ADP katalysiert, bei dem neben 3-Phosphoglycerat noch ein weiteres ATP entsteht (s. Abb. 26). Die weitere Verwendung von 3-Phosphoglycerat ist noch sehr spekulativ. In der *Toxoplasma*-Datenbank werden zwar Gene vorhergesagt, die in der Lage sind, aus 3-Phosphoglycerat in mehreren Schritten Serin

zu synthetisieren, allerdings konnten bei diesen Proteinen keine typischen Signalpeptide identifiziert werden.

3-Phosphoglycerat könnte alternativ auch aus dem Apicoplasten exportiert und wieder in die Glykolyse eingespeist werden. Damit würde der Apicoplast vom Zytosol aus sowohl mit Reduktionsäquivalenten als auch mit Energieträgern versorgt werden. Auch für diese Hypothese ist eine genauere Charakterisierung des Translocators notwendig.

Ein gegensätzliches System ist von den Chloroplasten bei Pflanzen bekannt. Dabei wird 3-Phosphoglycerat vom Zytosol in den Apicoplasten importiert und dort zu DHAP reduziert, welches anschließend wieder im Austausch für ein weiteres 3-Phosphoglycerat über einen Phosphat-Translocator ins Zytosol transportiert wird. Dadurch wird das Zytosol mit notwendigen Reduktionsäquivalenten und ATP beliefert, und im Chloroplasten eine Anreicherung von NAD(P)H vermieden (Held 1998).

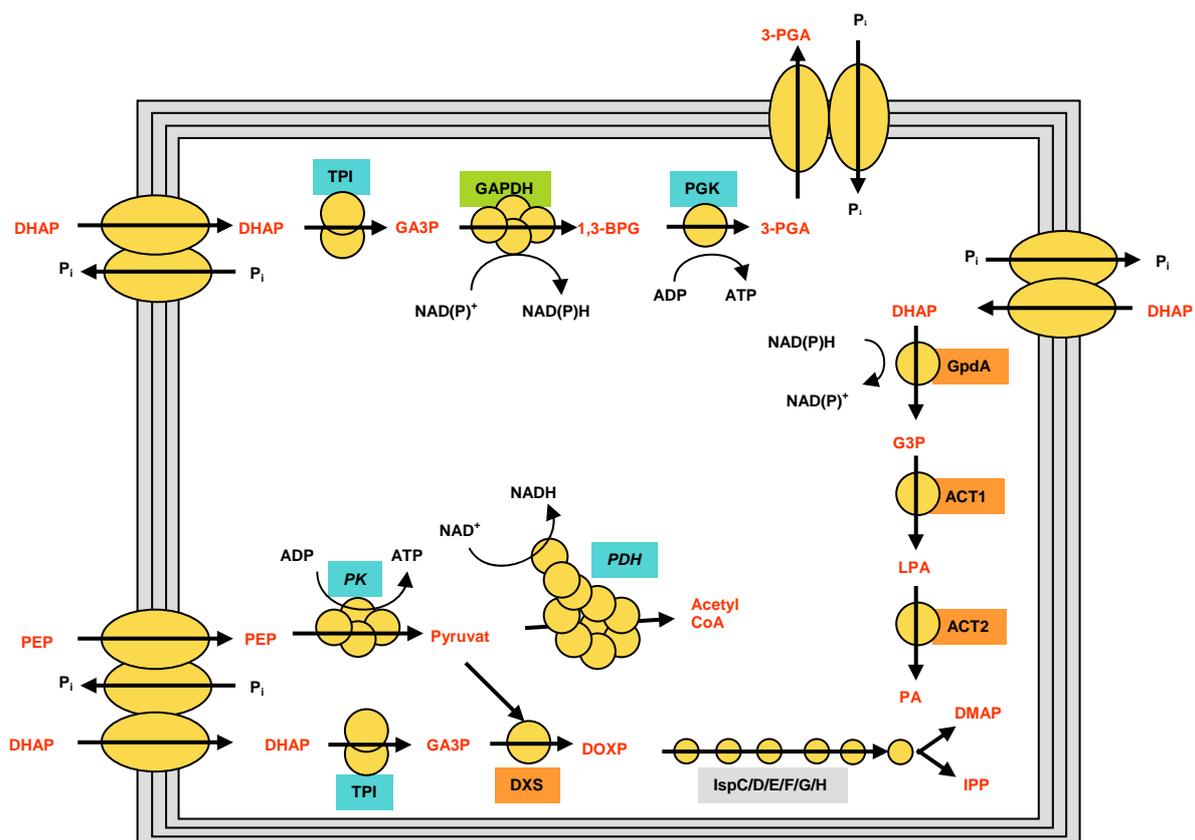


Abb. 27: Metabolitfluss im Apicoplasten von *T. gondii* II. Die Lokalisation der blau unterlegten Enzyme, sowie des Translocators wurde in dieser Arbeit experimentell gezeigt. Die orange unterlegten Enzyme zeigen bei *in silico*-Analysen typische Transportsignale für eine plastidische Lokalisierung, und bei dem grün unterlegtem GAPDH ist die Lokalisation im Apicoplasten publiziert. Die grau unterlegten Enzyme der Mevalonatsynthese sind bei *Plasmodium falciparum* im Apicoplasten gezeigt worden. Ausgehend von dem importierten DHAP zweigen mehrere Stoffwechselwege ab. Zum einen erfolgt die Synthese von Phosphoglyceriden bis zu dem Zwischenprodukt des Phosphatidat. DHAP Dihydroxyacetonphosphat; GpdA Glycerin-3-phosphat-

Dehydrogenase; G3P Glycerol-3-Phosphat; ACT1 *Glycerol-phosphat-acyltransferase*; LPA Lysophosphatidat; ACT2 *2-Lysophosphatidat-acyltransferase*; PA Phosphatidat. Desweiteren kann das gebildete in GA3P für die Mevalonat-unabhängige Isoprenoid Synthese genutzt werden. TPI *Triosephosphat-Isomerase*; GA3P Glyceraldehyd-3-Phosphat; DXS *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat-synthase*; DXOP 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat; DMAP Dimethylallyl-Pyrophosphat; IPP Isopentenyl Pyrophosphat. Außerdem erfolgt eine Umwandlung in 3-Phosphoglycerat, bei der neben Reduktionsäquivalente noch ATP regeneriert werden. GAPDH *Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*; 1,3 BPG 1,3-Bisphosphoglycerat; PGK *Phosphoglycerat-Kinase*; 3-PGA 3-Phosphoglycerat. Zusammen mit dem ATP aus der Synthese von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat, sowie dem NADH + H⁺, das bei der Reaktion des PDH-Komplexes entsteht, spiegeln diese Reaktionsfolgen die Schritte der Glykolyse wieder, bei denen energiereiche Verbindungen wie ATP, gebildet werden. Damit könnten sie im Apicoplasten für die Bereitstellung dieser benötigten Co-Faktoren eine essenzielle Rolle spielen. Nicht aufgezeigt ist die in Kapitel 4.1.2 diskutierte Verknüpfung mit der Fettsäuresynthese.

4.1.3 Metabolismus in Apicoplasten anderer Apicomplexa

Obwohl der Apicoplast eine essenzielle Rolle im Lebenszyklus des Parasiten einnimmt und ein typisches Merkmal der Apicomplexa ist, kommt er nicht bei allen Mitglieder des Phylums vor einige haben dieses Plastid sekundär wieder verloren. Das bekannteste Beispiel sind die Mitglieder der Gattung *Cryptosporidia*, die sich ebenfalls durch den Verlust ihres Mitochondriums auszeichnen (Rotte *et al.*, 2001).

Am bisher besten charakterisiert sind die Stoffwechselwege im Apicoplasten von *Plasmodium falciparum*. Im Gegensatz zu *Toxoplasma gondii* wurden bei diesem Parasiten nicht nur ein, sondern zwei plastidische Translocatoren identifiziert (Mullin *et al.*, 2006). Diese beiden Transporter sind in der innersten (PfiTPT) bzw. äußersten (PfoTPT) Membran des Apicoplasten lokalisiert und scheinbar hintereinander geschaltet. Sie sorgen dafür, dass phosphorylierte C₃-Körper aus dem Zytosol in den Apicoplasten transportiert werden können und stellen damit eine Verbindung zwischen der Glykolyse und der Fettsäuresynthese bzw. Lipidsynthese im Apicoplasten her. Im Gegensatz zu den bekannten Transportern in pflanzlichen Plastiden scheint es auch bei denen von *Plasmodium* keine Substratspezifität zu geben. Die Funktion der von Mullin *et al.* 2006 beschriebenen Transporter ähnelt der vermuteten Aufgabe des in dieser Arbeit identifizierten und im Apicoplasten lokalisierten Translocators. In *Toxoplasma* konnte allerdings nur der eine Transporter identifiziert werden, daher ist ein Vergleich der Funktionen schwierig. Es ist möglich, dass die Unterschiede zwischen den beiden Apicomplexa nur in der Unterteilung ihrer Transporter besteht. So scheinen PfiTPT und PfoTPT nicht in der Lage zu sein, Metabolite aus dem Apicoplasten zu transportieren sie sind nur für den Import verantwortlich.

Eine weitere Besonderheit bei *Plasmodium falciparum* ist das Fehlen einer zweiten Isoform der GAPDH. Bisher konnte nur die für die Glykolyse notwendige GAPDH im Zytosol lokalisiert werden, jedoch keine im Apicoplasten. Genauso wenig scheint im Genom von

Plasmodium falciparum eine Isoform der *Phosphoglycerat-Kinase* codiert zu sein. Damit ist das für *Toxoplasma gondii* vorgeschlagene System der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten und ATP durch einen Triosephosphataustausch über den Translocator bisher einzigartig.

Große Unterschiede im Stoffwechsel des Apicoplasten der beiden intrazellulären Parasiten sind bisher nicht identifiziert worden. Sowohl das für die Isoprenoid-Biosynthese benötigte GA3P als auch das Pyruvat werden durch die entsprechenden Enzyme im Apicoplasten (*Pyruvat-Kinase* und *Triosephosphat-Isomerase*) bereitgestellt. Nach der Fusion kann das entstehende 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat nicht nur für die weitere Isopentenyl-Synthese genutzt werden, ist ebenfalls ein essenzielles Ausgangsprodukt für die Herstellung von Thiaminpyrophosphat, ein notwendiger Co-Faktor für die E1-Untereinheit des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes*.

Ein Überbleibsel des photosynthetisch aktiven Plastiden sind die Anwesenheit von *Ferredoxin* und der *Ferredoxin NADP⁺ Reduktase* (FNR), die sowohl bei *Toxoplasma gondii*, als auch bei *Plasmodium falciparum* gefunden wurden (Vollmer *et al.*, 2001). In photosynthetisch aktiven Plastiden von Pflanzen werden Elektronen vom Photosystem I auf *Ferredoxin* übertragen und anschließend von der FNR zur Regenerierung von NADPH genutzt. Im Dunkeln erfolgt die reverse Reaktion, dabei wird NADPH durch FNR oxidiert und *Ferredoxin* reduziert. Im Apicoplasten kann dieses reduzierte *Ferredoxin* für zahlreiche Syntheseschritte benötigt werden. Unter anderem wird es mit der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern in Verbindung gebracht, die nicht nur bei *Arabidopsis thaliana*, sondern auch bei *Plasmodium falciparum* im Plastiden lokalisiert ist. Reduziertes *Ferredoxin* wird für die Bereitstellung von Schwefel benötigt, welches aus Cystein gewonnen wird. Die so gewonnenen Eisen-Schwefel-Cluster werden für Enzyme der Fettsäure- und Isoprenoid-Biosynthese benötigt (Arabidopsis Genome Initiative 2000; Vollmer *et al.*, 2001; Gardner *et al.*, 2002; Seeber *et al.*, 2002;). Der bisher bekannte Stoffwechselweg im Apicoplasten von *Plasmodium falciparum* ist in Abb. 28 dargestellt (modifiziert nach Ralph *et al.*, 2004).

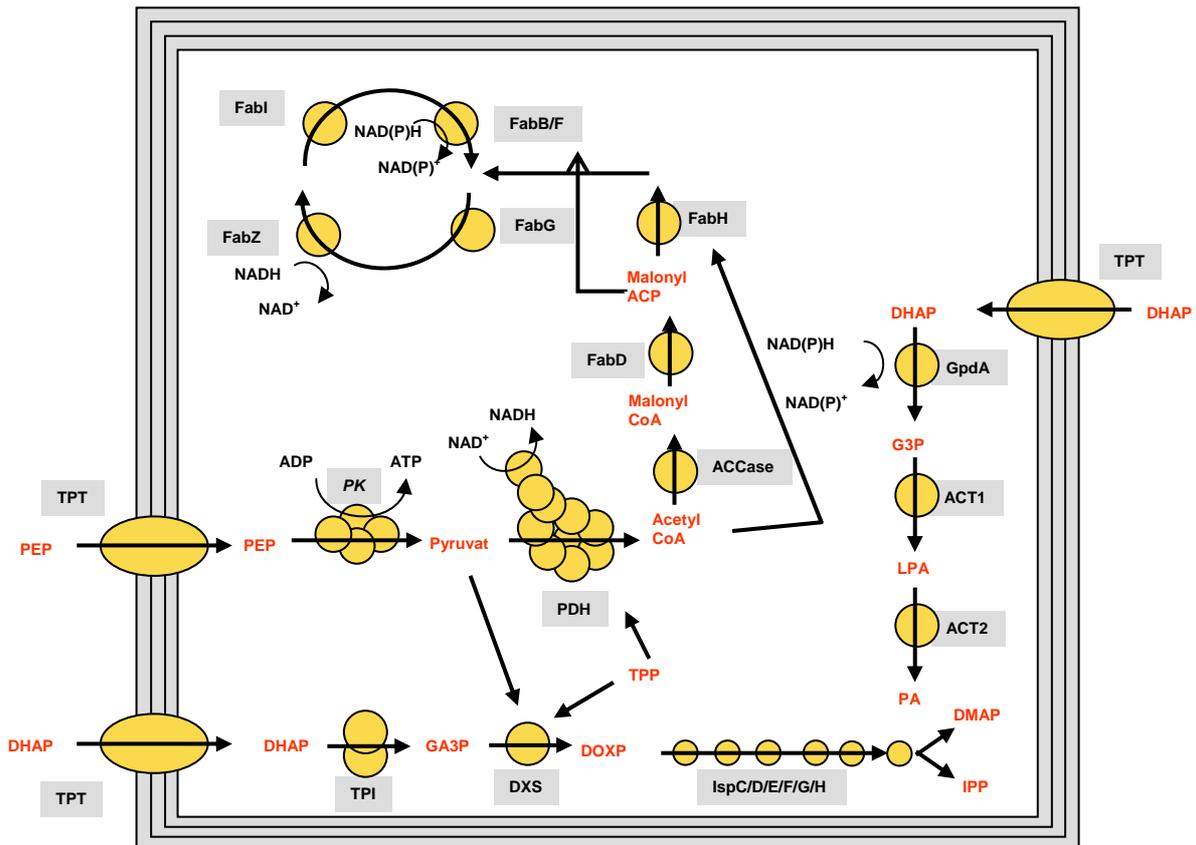


Abb. 28: Schematische Darstellung der bekannten Stoffwechselwege zur Synthese von Fettsäuren, Isoprenoiden und Glycolipiden im Apicoplasten von *Plasmodium falciparum* (modifiziert nach Ralph *et al.*, 2004). Nicht dargestellt ist die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern und das Mitwirken des Ferredoxin FNR Systems, sowie der Verbrauch von ATP (ACCase) bei der Fettsäuresynthese. FabD Malonyl-CoA-Transacetylase; FabH β -Ketoacyl-ACP-Synthase III; FabG β -Ketoacyl-ACP-Reduktase; FabZ β -Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase; FabI Enoyl-ACP-Reduktase; FabB/F β -Ketoacyl-ACP-Synthetase I/II

4.1.4 Der Metabolismus im Apicoplasten als Ziel für die Medikamentenentwicklung

Durch die Anwesenheit des Apicoplasten in den für den Menschen als Krankheitserreger bedeutsamen Parasiten Plasmodium und Toxoplasma sowie die Entdeckung seines für Eukaryoten ungewöhnlichen Stoffwechsels konnten neue Wirkpunkte für mögliche Medikamente identifiziert werden.

Ein Ansatzpunkt ist die Typ II-Fettsäuresynthese, die bei Pflanzen und Bakterien gut untersucht wurde und gegen die bereits Inhibitoren entwickelt wurden. Die *Acetyl-CoA-Carboxylase* (ACCase), der Startpunkt der Fettsäuresynthese im Apicoplasten, ist sowohl bei Pflanzen als auch bei Bakterien der regulierende Faktor dieser Biosynthese und daher ein gutes Ziel für Inhibitoren. Gegen die ACCase von Gräsern sind zwei Klassen von Herbiziden entwickelt worden, Aryloxyphenoxypropinates (fops) und Cyclohexanediones (dims). Sie

verhindern die Fettsäuresynthese in den Plastiden und führen zum Tod der Pflanze (Incedon und Hall, 1997). Die ACCase von *Toxoplasma gondii* kann ebenfalls von fops inhibiert werden, allerdings nicht von dims. Das Wachstum von Toxoplasma in HFF konnte mit Fops inhibiert werden, die IC₅₀-Werte variierten je nach Struktur des genutzten Inhibitors von weniger als 10 µM (bei Clodinafop) bis zu 400 µM (Zuther *et al.*, 1999).

Durch die großen Unterschiede sowohl in der Struktur als auch in den funktionellen Domänen der *Enoyl-ACP-Reduktase* (FabI) und der *β-Ketoacyl-ACP-Synthetase* I/II (FabB/F) sind diese Enzyme ebenfalls interessante Ziele für Medikamente. Thiolactomycin und Triclosan sind Inhibitoren von FabB/F bzw. FabI, deren Wirkungsweise bei pflanzlichen und bakteriellen Enzymen intensiv studiert wurden und keinen Einfluss auf die humane Fettsäuresynthese haben. Thiolactomycin dient dabei als Konkurrent von Malonyl-ACP und inhibiert vermutlich die Kondensation von Acyl-ACP mit Malonyl-ACP und damit die Kettenverlängerung der Fettsäuresynthese durch FabB/F. Ein Analogon von Thiolyctomycin dagegen verhindert die Fusion von Acetyl-CoA mit Malonyl-ACP und damit die *β-Ketoacyl-ACP-Synthetase* III (FabH) (Prigge *et al.*, 2003). Triclosan dagegen ist ein Inhibitor der *Enoyl-ACP-Reduktase*, sowohl bei Pflanzen und Bakterien, aber auch bei Plasmodium und Toxoplasma. Es bildet dabei einen Komplex mit dem Enzym und dem für die Reaktion notwendigen Co-Faktor NAD⁺ (Perozzo *et al.*, 2002). Die bisher getesteten Inhibitoren der Typ II-Fettsäuresynthese wurden nicht speziell für Apicomplexa entwickelt, sondern als Herbizide gegen Pflanzen oder gegen Bakterien eingesetzt. Daher sind ihre IC₅₀-Werte zu hoch, um als effektive Medikamente eingesetzt zu werden, allerdings zeigen sie Möglichkeiten auf, die sich durch die Identifizierung von Stoffwechselwegen im Apicoplasten ergeben.

Toxoplasma gondii ist in der Lage, die von ihm benötigten Phospholipide nicht nur von der Wirtszelle zu beziehen, sondern auch selber zu synthetisieren. Diese Synthese könnte ebenfalls ein interessantes Ziel für mögliche Medikamente sein, besonders nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl Plasmodium als auch *Toxoplasma gondii* auf die Synthese von Phosphatidylcholin angewiesen sind (Ancelin *et al.*, 2003) und der Verlust dieser Möglichkeit bei *T. gondii* zu einer sehr stark eingeschränkten Replikation führt (Gupta *et al.*, 2005). Das für die Synthese benötigte Phosphatidat wird im Apicoplasten hergestellt, daher wäre dieser Biosyntheseweg ebenfalls ein Ansatzpunkt für die Entwicklung von Medikamenten gegen die genannten Parasiten.

Der Isoprenoid-Biosyntheseweg ist ein weiterer Lipidsyntheseweg im Apicoplasten, der eine Reihe von Enzymen nutzt, die charakteristisch für Pflanzen, Algen und Bakterien sind, in Säugerzellen aber nicht gefunden werden. Dieser Mevalonat-unabhängige Isoprenoid-

Biosyntheseweg wird auch als MEP-Syntheseweg bezeichnet, da er auf der Bildung von 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat und 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) aus Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat beruht.

Fosimycin war *in vitro* in der Lage, das Wachstum von multiresistenten *Plasmodium falciparum* zu inhibieren. Die Wirkung von Fosimycin liegt in der Inhibierung von *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat-synthase* (DXS), dem Enzym, das den ersten Schritt der Isoprenoid-Biosynthese katalysiert, die oben erwähnte Fusion von Pyruvat und GA3P (Jomaa *et al.*, 1999). Auf *T. gondii* hat Fosimycin allerdings keine Wirkung (Ling *et al.*, 2005), obwohl alle notwendigen Enzyme im Genom codiert sind. Sie besitzen scheinbar eine andere Struktur und können daher von Fosimycin nicht inhibiert werden. Andere bekannte Isoprenoid-Biosynthese-Inhibitoren, wie die Bisphosphonate, hemmen dagegen das Wachstum von *Toxoplasma gondii*. Am effektivsten waren dabei alkalische Bisphosphonate, die das Enzym *Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase* (FPPS) hemmen und damit die Synthese von Farnesyl-Pyrophosphat, einem C₁₅-Körper, der aus drei Einheiten Isopentenyl-Pyrophosphat besteht und für vielfältige Funktionen benötigt wird (Ling *et al.*, 2005). Viele Proteine, die an der Signalübertragung und der Zielsteuerung von Proteinen beteiligt sind, tragen einen Farnesylrest an ihrem carboxyterminalen Ende. Die genaue Wirkung der alkalischen Bisphosphonate konnte zwar noch nicht ermittelt werden, aber es wird vermutet, dass sie die Prenylierung von kleinen GTPasen verhindern, die eine regulatorische Aufgabe in vielen zellulären Funktionen erfüllen (Sonda S. und Hehl AB., 2006)

4.2 Der Zitronensäure-Zyklus

In aeroben Eukaryoten ist der Zitronensäure-Zyklus der wichtigste Stoffwechselweg im Mitochondrium. Hier erfolgt die vollständige Degradation von C₂-Körper, bei der sowohl direkt Energie in Form von GTP entsteht, als auch indirekt über die gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und FADH. Diese werden für den Aufbau eines Protonengradienten über die innere Membran hinweg benötigt, der anschließend eine ATPase antreibt.

Der TCA-Zyklus liefert außerdem wichtige Zwischenprodukte für weitere Biosynthesen, α -Ketoglutarat und Oxalacetat werden für die Synthese von Aminosäuren benötigt und Succinyl-CoA dient als Vorstufe für die Bildung von Porphyrinen.

Bisherige Studien belegten, das *Toxoplasma gondii* für seine Energiegewinnung hauptsächlich auf die Glykolyse angewiesen ist, und die Existenz eines vollständigen TCA-Zyklus daher in Frage gestellt wurde.

4.2.1 Die Enzyme des TCA-Zyklus in *Toxoplasma gondii*

In dieser Arbeit konnten nicht nur sämtliche Gene des TCA-Zyklus identifiziert werden, auch ihre Lokalisation im einzigen Mitochondrium wurde gezeigt. Allerdings gibt es einige Besonderheiten:

- (i) Zum einen ist der einzige PDH-Komplex des Parasiten ausschließlich im Apicoplasten lokalisiert. Damit fehlt die essenzielle Verbindung zwischen dem Endprodukt der Glykolyse, dem Pyruvat, und dem Ausgangsprodukt des TCA-Zyklus, dem Acetyl-CoA.
- (ii) Desweiteren befindet sich im Mitochondrium keine NAD^+ -abhängige *Isocitrat-Dehydrogenase*, sondern nur eine NADP^+ -abhängige.
- (iii) Weiterhin konnte keine „GTP“ sondern nur eine „ATP“ produzierende *Succinyl-CoA-Synthetase* identifiziert werden.
- (iv) Auch die *Fumarase* ist nicht die für Eukaryoten typische Klasse II-*Fumarase*, sondern repräsentiert die aus einigen Bakterien und Archea bekannte Klasse I, die sich dadurch auszeichnen, dass sie einen Eisen-Schwefel-Cluster besitzen.
- (v) Die identifizierte *Malat-Dehydrogenase* besitzt eine große Ähnlichkeit zu den *Lactat-Dehydrogenasen*, aus denen sie wahrscheinlich entstanden ist, und wird phylogenetisch der Klasse I MDHs zugeordnet, in der neben den LDHs die MDHs von Cyanobakterien und α -Proteobakterien eingeordnet werden (Schnarrenberger und Martin, 2002).

Sie unterscheidet sich daher genauso wie die *Fumarase* deutlich von denen, die normalerweise im Mitochondrium gefunden werden, da sie prokaryotische Formen repräsentieren. Interessanterweise konnte im Genom keine weitere MDH identifiziert werden, so dass davon auszugehen ist, dass weder im Zytosol noch in anderen Kompartimenten eine Isoform zu finden ist. Damit wäre auch die Anwesenheit von Malat-abhängigen Shuttlesystemen, wie das Malat:Oxalacetat oder Malat:Aspartat Shuttle, fraglich. Im Zytosol könnte aus Malat kein Oxalacetat synthetisiert werden und damit wäre ein Austausch über die Membranen nicht mehr möglich. Allerdings müsste dafür noch überprüft werden, ob nicht

Spleißvarianten gebildet werden können die anschließend im Zytosol verbleiben. Jedoch gibt es bisher keine Hinweise dafür.

Desweiteren wurde im Mitochondrium eine *FAD-abhängige Malat-Dehydrogenase*, auch als *Malat:Quinone-Oxidoreduktase* bezeichnet, lokalisiert, die FAD^+ anstatt NAD^+ als Elektronenakzeptor nutzt und diese direkt an das Coenzym Q weiterzuleiten. Diese Reaktion ist energetisch ungünstiger als die der MDH, allerdings nicht reversibel.

4.2.2 Ungewöhnliche Mitochondrien bei Protozoen

Die klassische Funktion des Zitronensäure-Zyklus scheint nicht nur bei *Toxoplasma gondii* zu fehlen, auch bei anderen Protozoen, wie z.B. *Trypanosoma brucei* und *Plasmodium* ssp. erfüllt der TCA-Zyklus unterschiedliche Funktionen.

Trypanosoma brucei ist ein einzelliger Eukaryont und der Erreger der Schlafkrankheit, der in unterschiedlichen Stadien in seinem Zwischen- und Endwirt vorkommt. An diese unterschiedlichen Umgebungen hat sich dieses Protozoan mit seinem Stoffwechsel angepasst. Neben Kohlenstoffverbindungen werden auch Prolin und Threonin für die Energiegewinnung genutzt. Alle Enzyme für einen vollständigen TCA-Zyklus sind im Genom codiert und werden exprimiert. Die Funktion des Zyklus ist relativ ungewöhnlich (s. Abb. 29). Von van Weelden *et al.* 2005 und van Hellemond *et al.* 2005 wurde gezeigt, dass der Zitronensäure-Zyklus sowohl an ana- wie katabolischen Prozessen beteiligt ist. Der Bereich des Zyklus von α -Ketoglutarat bis zur Synthese von Succinat wird für den Abbau von Prolin genutzt, einem katabolischen Prozess. Das für die Fettsäuresynthese benötigte Acetyl-CoA muss aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert werden. Dies geschieht über ein Malat-Citrat-Shuttle System, bei dem Citrat anschließend im Zytosol in Oxalacetat und Acetyl-CoA aufgespalten wird. Folglich stellt die mitochondriale *Citratsynthase* das für diesen Prozess benötigte Citrat zur Verfügung. Die *Malat-Dehydrogenase* ist für die Bereitstellung von Oxalacetat und der PDH-Komplex für das notwendige Acetyl-CoA verantwortlich, aus denen anschließend Citrat synthetisiert wird. Eine weitere anabolische Funktion führt der Zyklus durch seine Teilnahme an der Gluconeogenese aus. Succinat wird in Malat umgewandelt, das anschließend ins Zytosol transportiert wird und dort für die Phosphoenolpyruvat Synthese benötigt wird (van Weelden *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der Prolinabbau über Teile des TCA-Zyklus mit den Zwischenstufen α -Ketoglutarat, Succinyl-CoA, Succinat, Fumarat, Malat erfolgt. Anschließend wird Malat aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert und dort

über PEP in weitere Produkte umgesetzt wird. Bis auf die *Aconitase* und die *Isocitrat-Dehydrogenase* haben alle am Zitronensäure-Zyklus beteiligten Enzyme eine andere Aufgabe übernommen. Da für die *Isocitrat-Dehydrogenase*, die ebenfalls eine NADP^+ -abhängige ist, nur eine sehr geringe Aktivität nachgewiesen werden konnte und eine *Aconitase*-Deletionsmutante keinerlei Phänotyp zeigte, wird angenommen, dass der TCA-Zyklus nicht mehr seiner ursprünglichen Aufgabe nachkommt (van Weelden *et al.*, 2005; van Hellemond *et al.*, 2005).

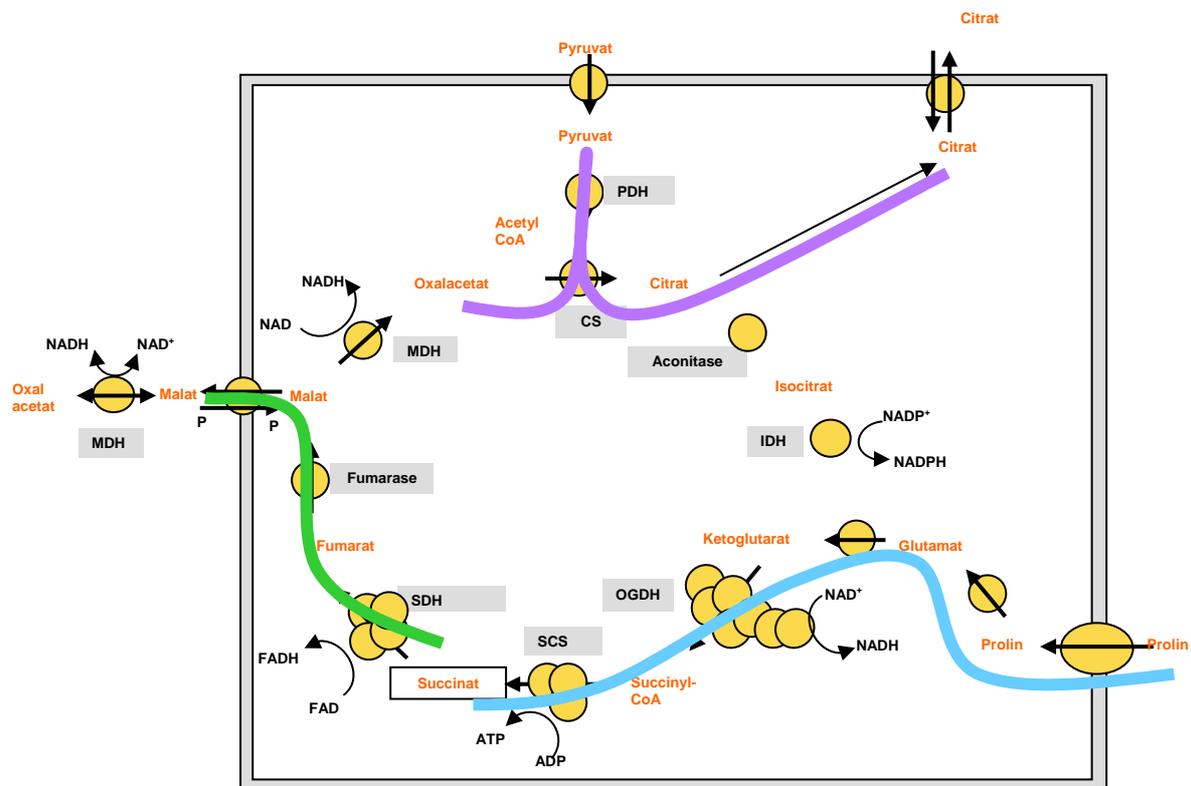


Abb. 29: Schematische Darstellung der ungewöhnlichen Funktion des TCA-Zyklus von *Trypanosoma brucei* (modifiziert nach van Weelen *et al.*, 2005). Die einzelnen metabolischen Unterteilungen sind farblich unterlegt, einmal die Synthese von Succinat aus Prolin, gefolgt von der Umwandlung des Succinat zu Oxalacetat im Zytosol und drittens die Citratsynthese für die Biosynthese der Fettsäuren.

Cryptosporidium parvum, ein weiteres Mitglied des Phylum der Apicomplexa, besitzt kein Mitochondrium mehr. Es ist sekundär wieder verloren gegangen. Allerdings konnte ein mitochondriales Kompartiment identifiziert werden, das aber kein eigenes Genom besitzt. Nach der Sequenzierung und Annotation des kompletten Genoms wurden zwar Proteine identifiziert, die ein klassisches Importsignal tragen, darunter waren aber keine Enzyme des Zitronensäure-Zyklus (Xu *et al.*, 2004).

Auch bei *Plasmodium falciparum* ist die Funktion des TCA-Zyklus noch weitgehend ungeklärt. Wie bei *Toxoplasma* befindet sich der einzige PDH-Komplex im Apicoplasten und

damit fehlt die Zufuhr von Acetyl-CoA, um aus Oxalacetat Citrat zu synthetisieren, obwohl auch hier eine *Citratsynthase* im Mitochondrium lokalisiert ist. Die im Zyklus folgende *Aconitase* spiegelt eine Besonderheit wieder. Sie scheint eine Doppelfunktion zu haben: Zum einen im Zytosol als Eisen-Response-Protein (IRP) und zum anderen gleichzeitig im Mitochondrium bei der klassischen Synthese von Citrat zu Isocitrat (Hodges *et al.*, 2005). Auch die folgende *Isocitrat-Dehydrogenase*, vergleichbar zu der von *Trypanosoma brucei* und *Toxoplasma gondii*, ist nicht auf NAD⁺ sondern auf NADP⁺ als Co-Faktor angewiesen. Bei *Plasmodium falciparum* wurde sie allerdings relativ gut charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass sie bei oxidativem Stress hoch reguliert ist (Wrenger und Muller, 2003). Das dabei gebildete NADPH scheint anschließend als Reduktionsäquivalent für Enzyme des Antioxidantsystems zu dienen (Muller 2004). Die folgenden Schritte innerhalb des Kreislaufs unterscheiden sich scheinbar nicht: Sowohl sämtliche Untereinheiten der *α-Ketoglutarat-Dehydrogenase* als auch eine GTP- und eine ATP-abhängige *Succinyl-CoA-Synthetase* sind vorhanden, genauso wie die *Succinat-Dehydrogenase*. Die folgende *Fumarase* gehört ebenfalls zu der Klasse II dieser Enzyme, wie es für *T. gondii* in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Der letzte Schritt dieses Zyklus, die Umwandlung von Malat in Oxalacetat, wird von einer FAD-abhängigen *Malat-Dehydrogenase* vorgenommen. Im Gegensatz zu Toxoplasma befindet sich keine weitere MDH im Mitochondrium, sondern hier ist eine Isoform im Zytosol lokalisiert. Die genaue Funktion dieses TCA-Zyklus ist noch vollständig unverstanden (s. Abb. 30). Microarray-Daten zeigten allerdings, dass in den Ookineten die Expression fast aller Enzyme dieses Zyklus Hochreguliert ist (van Dooren *et al.*, 2006).

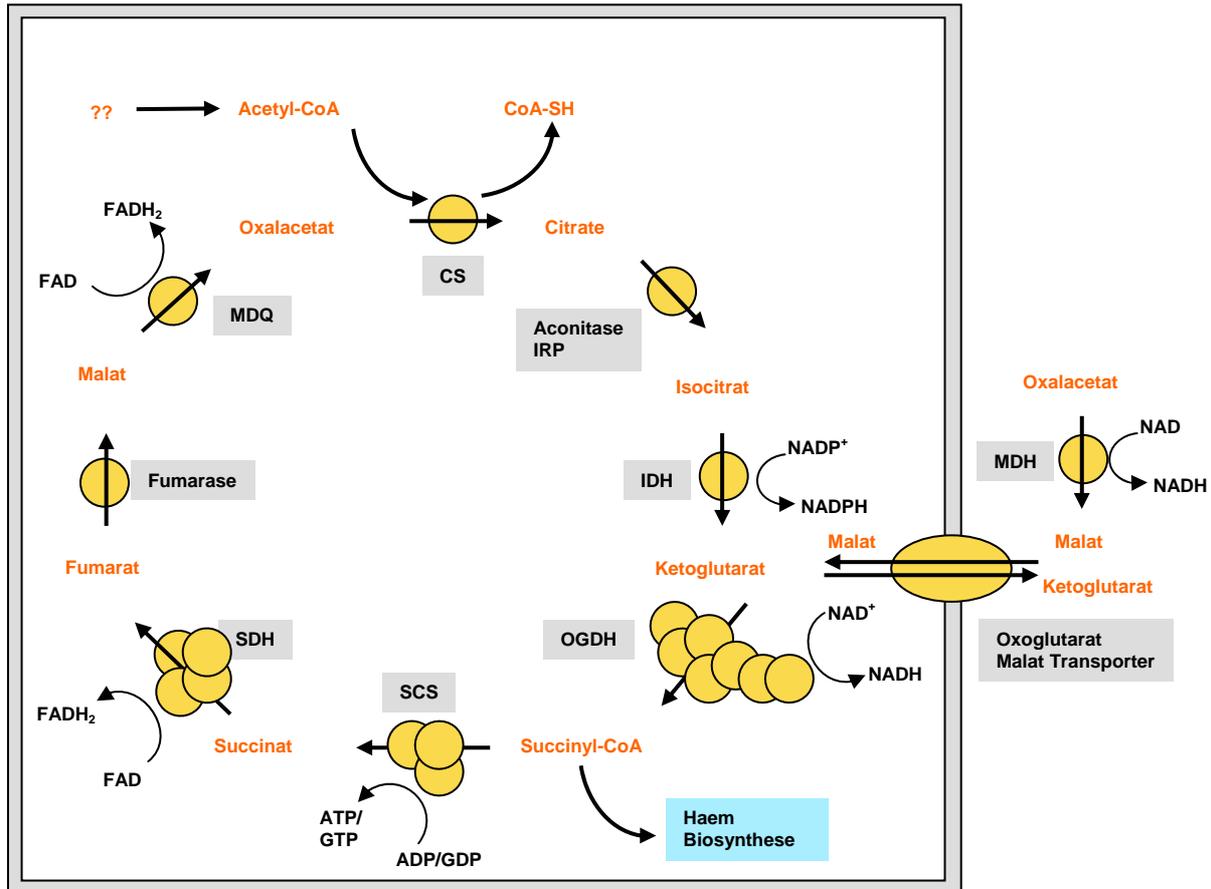


Abb. 30: Schematische Darstellung des TCA-Zyklus im Mitochondrium von *Plasmodium falciparum*, sowie die bisher identifizierten Shuttlesysteme

4.2.3 Mögliche Acetyl-CoA Quellen

Acetyl-CoA wird für den Start des TCA-Zyklus benötigt, um mit Oxalacetat zu Citrat fusioniert zu werden. Es entsteht entweder aus der Umwandlung von Pyruvat durch den *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* oder wird von anderen katabolischen Reaktionen produziert.

Da bei *T. gondii* der PDH-Komplex im Apicoplasten und nicht im Mitochondrium lokalisiert ist, muss das benötigte Acetyl-CoA von einer alternativen Quelle bereitgestellt werden. Ohne diese Substrat für die *Citratsynthase* wäre die Funktion des TCA-Zyklus als solcher nicht vorstellbar und die Anwesenheit von wenigstens einer Citratsynthase im Mitochondrium schwer erklärbar. Durch eine *in silico*-Analyse auf mögliche mitochondriale Importsignale mit MitoProt erfolgte in dieser Arbeit die Vorhersage der Lokalisierung.

Eine bekannte Reaktion, bei der im Mitochondrium Acetyl-CoA entsteht, ist die β -Oxidation von Fettsäuren. Dabei werden die Fettsäuren an der äußeren Mitochondrienmembran aktiviert und in die innere Mitochondrienmembran transportiert. Anschließend wird in einer

wiederholten Sequenz von vier Reaktionen jeweils das gesättigte Acyl-CoA abgebaut, bei dem die Fettsäure jeweils um eine C₂-Einheit verkürzt wird und FADH₂, NADH und Acetyl-CoA freiwerden. Weder bei *Toxoplasma gondii* noch bei *Plasmodium* ssp. konnten bisher die für die β -Oxidation benötigten Enzyme identifiziert werden, die entsprechenden Gene sind im Genom nicht codiert (van Dooren *et al.*, 2006). Folglich kann auf diese Weise kein Acetyl-CoA für den TCA-Zyklus produziert werden.

Acetaldehyd kann ebenfalls in Acetyl-CoA umgewandelt werden, wobei als Zwischenschritt Acetat entsteht. Die *Aldehyd-Dehydrogenase* (EC-Nr. 1.2.1.3; GenID: 41.m00032) reduziert das Acetaldehyd zu Acetat, das von der *Acetat-CoA-Ligase* (EC-Nr. 6.2.1.1; GenID 57.m03124) in Acetyl-CoA umgewandelt wird (Stryer 2004). Analysen mit MitoProt zeigen, dass ein mitochondriales Importsignal nicht vorhanden war.

Das bei der Degradierung der beiden ketogenen Aminosäuren Leucin und Isoleucin entstehende Acetyl-CoA könnte eine weitere Möglichkeit bieten, die Reaktion des TCA-Zyklus zu starten. Der erste Schritt dieses Katabolismus, eine Transaminierung, wird von der *Branched Chain Aminosäure Transaminase* (EC-Nr. 2.6.1.42; GenID: 113.m01283) durchgeführt, die im Mitochondrium lokalisiert ist. Auch der folgende Schritt, die oxidative Decarboxylierung durch die *Branched Chain Oxoglutarat-Dehydrogenase*, findet im Mitochondrium statt. Die Anwesenheit dieses Enzym-Komplexes wurde in dieser Arbeit mit Hilfe entsprechender Fusionsproteine gezeigt. Dabei entsteht aus Leucin Isovaleryl-CoA und 2-Methylbutanoyl aus Isoleucin. Der nächste Schritt, bei dem Isovaleryl-CoA oxidiert und dabei in β -Methylcrotonyl-CoA überführt wird, erfolgt wahrscheinlich im Zytosol. Bei der dieser Reaktion katalysierenden *Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase* (1.3.99.2; GenID 20.m03909) konnte kein mitochondriales Importsignal identifiziert werden.

Auch die Enzyme, die für die Oxidation von 2-Methylbutanoyl verantwortlich sind, scheinen nicht im Genom kodiert zu sein. Eventuell kann eine im Mitochondrium befindliche *Acyl-CoA-Dehydrogenase* (EC 1.3.99.-; GenID 57.m01780) die Acyl-CoA Ester oxidieren und damit diese Aufgabe übernehmen, so dass 2-Methylcrotonoyl-CoA entsteht. Allerdings befindet sich das für die nachfolgende Carboxylierung benötigte Enzym (EC 4.2.1.17; GenID 42.m05838), die *Enoyl-CoA-Hydratase*, ebenfalls im Zytosol. Folglich scheint der Abbau von Aminosäuren ebenfalls kein Acetyl-CoA für den TCA-Zyklus bereit zu stellen.

Es konnte jedoch eine *Acetyl-CoA-Acetyltransferase* (EC 2.3.1.9; GenID: 162.m00308) identifiziert werden, die Acetoacetyl-CoA spaltet und mit CoA als Co-Faktor 2 Acetyl-CoA gebildet werden. *3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase* (EC 1.1.1.157; GenID 44.m02702) oxidiert S-3-Hydroxy-butanoyl-CoA, woraus Acetoacetyl-CoA entsteht. Es besteht allerdings

die Möglichkeit, dass die Annotation nicht ganz korrekt ist und dieses Enzym als Substrat R-3-Hydroxy-butanoyl-CoA nutzt. Dieses R-3-Hydroxy-butanoyl-CoA wird durch eine 3-Hydroxybuturyl-CoA-Dehydrogenase (EC 4.2.1.55; GenID 20.m03697) aus Crotonyl-CoA hergestellt. Dieses Enzym scheint ebenfalls im Mitochondrium lokalisiert zu sein. Auch die für den Abbauprozess von Tryptophan, Lysin, Phenylalanin und Tyrosin benötigten Gene sind bisher nicht vollständig im Genom identifiziert worden oder tragen ebenfalls kein Importsignal für das Mitochondrium.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keinen offensichtlichen Syntheseweg gibt, über den Acetyl-CoA im Mitochondrium produziert werden kann. Es besteht die Möglichkeit, dass aus S- oder R-3-Hydroxy-Butanoyl-CoA durch eine Oxidation, gefolgt von einer Transferasereaktion, 2 Acetyl-CoA synthetisiert werden können. Von welchen Enzymen dieses Hydroxy-Butanoyl-CoA im Mitochondrium produziert werden kann, ist jedoch noch unklar. Dieser diskutierte Syntheseweg wird normalerweise für die Verlängerung von Fettsäuren benötigt. Da die Fettsäuresynthese inklusive des Verlängerungszyklus bei *T. gondii* allerdings im Apicoplasten bzw. im Zytosol stattfindet, könnte die Anwesenheit der im Mitochondrium lokalisierten Enzyme auf einen speziellen Abbauweg von Aminosäuren zur Acetyl-CoA Generierung hindeuten.

4.2.4 TCA-Zyklus oder kein Zyklus

Da nicht abschließend geklärt werden kann, ob Acetyl-CoA aus dem Abbau von Aminosäuren im Mitochondrium entstehen kann, ist es schwierig, eine eindeutige Aussage über die Funktion des TCA-Zyklus zu treffen. Sollte Acetyl-CoA wie angedeutet vorhanden sein, würde der Zitronensäure-Zyklus als solcher funktionieren und durch den Abbau der C₂-Einheit sowohl NADH für die Atmungskette - und somit Energie - als auch Zwischenstufen für weitere Metabolitsynthesen bereitstellen.

Allerdings zeigen die Enzyme des TCA-Zyklus bei *T. gondii* einige Besonderheiten auf, die eher ungewöhnlich sind:

- (i) Die *Citratsynthase*, das Enzym für die Kondensation von Acetyl-CoA mit Oxalacetat, wird auf RNA-Ebene nur sehr schwach exprimiert. Der Vergleich mit den anderen Enzymen des TCA-Zyklus zeigt einen bis zu 100-fachen Unterschied. Über die Proteinmenge und vor allem die Enzymaktivität lässt sich dadurch jedoch keine Aussage treffen. Auch bei *Plasmodium* ssp. ist die *Citratsynthase* nicht genauer charakterisiert worden.

(ii) Die identifizierten, aber nicht lokalisierten Isoformen befinden sich nach *in silico*-Analysen nicht im Mitochondrium von *T. gondii*. Für die Isoform II (GenID 20.m03767) bestehen Hinweise darauf, dass sie im Apicoplasten lokalisiert ist. Die *ATP-Citrat-Lyase* (Citratsynthase III) wird hingegen im Zytosol vermutet, wo sie für die Spaltung von Citrat in Oxalacetat verantwortlich ist. Dabei wird ATP verbraucht und Acetyl-CoA freigesetzt. Diese Reaktion ist normalerweise für die Übertragung von Acetyl-CoA aus dem Mitochondrium ins Zytosol verantwortlich, wobei das Acetyl-CoA für die zytosolische Fettsäuresynthese benötigt wird. Dieses System könnte eine weitere Möglichkeit darstellen, um Acetyl-CoA in das Mitochondrium zu transportieren: Acetyl-CoA wird im Apicoplasten hergestellt, von einer *Citratsynthase* mit Oxalacetat zu Citrat fusioniert und anschließend ins Zytosol und weiter zum Mitochondrium transportiert. Dies würde allerdings die *Citratsynthase* im Mitochondrium überflüssig machen.

(iii) Citrat wird im Mitochondrium zu Isocitrat isomerisiert. Diese Reaktion erfolgt durch die *Aconitase*. Bei *Plasmodium* wurde gezeigt, dass dieses Enzym sowohl im Mitochondrium als klassische *Aconitase*, als auch im Zytosol lokalisiert ist, als Eisen-Response-Bindeprotein wirkt (Hodges *et al.*, 2005). Im Vergleich der *Aconitasen* von *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* zeigte sich, dass beide identische konservierte Domänen besitzen und daher das Enzym von *T. gondii* vergleichbare Eigenschaften aufweist. Da die zytosolische Form durch alternatives Spleißen entsteht, und in dieser Arbeit cDNA für die Expression genutzt wurde, lässt sich eine Doppellokalisierung jedoch nicht bestätigen.

(iv) Auch bei der *Isocitrat-Dehydrogenase* fallen einige Besonderheiten auf. Als Co-Faktor wird NADP⁺ und nicht NAD⁺ benötigt. Das deutet darauf hin, dass - wie in anderen Protozoen - die IDH bei *T. gondii* eine regulatorische Funktion im Anti-Oxidations-System des Mitochondriums einnimmt. Ihr Beitrag für den TCA-Zyklus läge daher nur in der Bereitstellung von Ketoglutarat.

(v) Während der *α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex* keine Besonderheiten aufweist, ist von der *Succinyl-CoA-Synthetase* nur eine ATP-abhängige Variante zu finden. Normalerweise gibt es sowohl eine GTP- wie auch eine ATP-spezifische Untereinheit. Die *Succinyl-CoA-Synthetase* besteht aus zwei Untereinheiten, wobei die Alpha-Untereinheit dieses Enzyms identisch und die Beta-Untereinheit jeweils spezifisch für das Nukleotid ist. Im Genom von *T. gondii* ist nur eine ATP-spezifische Untereinheit kodiert, was bedeutet, dass bei der Umwandlung von Succinyl-CoA in Succinat mit dem ATP der Schwerpunkt dieser Reaktion auf der Energiegewinnung liegt. Das bei dieser Reaktion normalerweise freigesetzte

GTP hat eher eine regulatorische Funktion in der Proteinbiosynthese oder in Signaltransduktionskaskaden (Johnson *et al.*, 1998).

Der konditionelle Knock-out der Alpha-Untereinheit dieses Gens führte zwar zu einem verminderten Wachstum, was evtl. auf den Verlust des bei dieser Reaktion gebildeten ATP zurückzuführen ist, zeigte ansonsten aber keinen weiteren Phänotyp. Der Verlust des gebildeten Succinats scheint den Parasiten daher nicht essenziell zu beeinträchtigen. Zwischenstufen für weitere Biosyntheseschritte bildet das Substrat dieser Reaktion, das Succinyl-CoA, welches für die Synthese von Porphyrinen und Haem benötigt wird. Da es keine bekannte Auffüllreaktion für Succinat gibt, kann durch katabolische Prozesse der Verlust des Enzyms nicht ausgeglichen werden. Der TCA-Zyklus ist dementsprechend unterbrochen, was allerdings nur zu einem verlangsamten Wachstum führt. Der Verlust der *Succinyl-CoA-Synthetase* sorgt wahrscheinlich letztendlich dafür, dass dem Parasiten weniger Energie zur Verfügung steht, da das von diesem Enzym gebildete ATP und das in der Folgereaktion bei der Umwandlung von Succinat in Fumarat gebildete FADH₂ fehlt. Fumarat dagegen kann durch den Abbau von Aminosäuren wieder in den TCA-Zyklus eingespeist werden.

Die Zugabe von externem Succinat führt bei den Wildtyp-Parasiten zu einem gesteigerten Wachstum. Die Funktion der ausgeschalteten *Succinyl-CoA-Synthetase* in der KO-Mutante wird dagegen nicht nur komplementiert, sondern bei ihr für die externe Zugabe von Succinat zu einem zum Wildtyp vergleichbarem Wachstum. Mögliche Verzweigungen des Succinats zu anderen Stoffwechselwegen konnten bisher nicht identifiziert werden, da die dafür benötigten Enzyme (außer der *Methylcitratsynthase* die nach in silico Daten keinerlei Transportsignale aufweist) nicht vorhanden. Das Vorhandensein und die Lokalisation des Methylcitrat-Zyklus bleibt jedoch unklar. Dass die Zugabe von externem Succinat bei den Wildtyp-Parasiten ebenfalls zu einer gesteigerten Wachstumsrate führte, kann ebenfalls dadurch erklärt werden, dass dem Parasiten durch dessen Metabolisierung mehr Energie in Form von FADH₂ zur Verfügung stand und er deshalb schneller replizieren konnte.

Die Anwesenheit von zwei *Malat-Dehydrogenasen* im Mitochondrium, wovon eine direkt mit dem Ubiquinon der Atmungskette verknüpft ist, wirft weitere Fragen zur Funktion des TCA-Zyklus auf. Beide Enzyme üben mit der Umwandlung von Malat in Oxalacetat dieselbe Funktion aus. Sie benutzen dabei allerdings unterschiedliche Elektronenakzeptoren. Vergleicht man die energetische Situation der beiden MDHs, so liegt der Vorteil bei der NAD-spezifischen MDH: NADH kann früher der Atmungskette zugeführt werden und führt daher zu einer größeren Produktion von ATP im Vergleich zur FAD-abhängigen. Bei der

von der FAD-abhängigen MDH katalysierten Reaktion liegt der energetische Schwerpunkt auf der Produktion von Oxalacetat.

Wann welches dieser Enzyme genutzt wird, ist durch die Lokalisierungsexperimente schwer vorherzusagen. Es könnte sein, dass die Regulation durch den Elektronenakzeptor an sich geregelt wird: Während FADH direkt der Atmungskette zugeführt wird, kann NADH als Reduktionsäquivalent für weitere Biosynthesewege dienen.

Eine weitere, wahrscheinlich noch wichtigere Konsequenz der Anwesenheit von beiden im Genom kodierten *Malat-Dehydrogenasen* im Mitochondrium, ist die Tatsache, dass durch das Fehlen einer zytosolischen Isoform weder ein funktionierendes Malat-Aspartat noch ein Malat-Oxalacetat-Shuttle in *Toxoplasma gondii* existieren können. Inwiefern trotzdem ein Stoffaustausch zwischen dem Mitochondrium und dem Zytosol stattfinden kann, ist eine weitere Frage die noch der Klärung bedarf.

Ein weiteres Enzym, das dem TCA-Zyklus angegliedert ist, ist die *Pyruvat-Carboxylase*. Sie ist für die Konversion von Pyruvat in Oxalacetat verantwortlich und konnte in dieser Arbeit ebenfalls im Mitochondrium lokalisiert werden. An die *Pyruvat-Carboxylase* ist als aktive Gruppe ein Biotin gebunden, das für die Übertragung des CO₂ auf Pyruvat essenziell ist. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, muss das Biotin durch Acetyl-CoA aktiviert werden. Biotin wird nicht carboxyliert, wenn kein Acetyl-CoA oder alternativ Acyl-CoA an das Enzym gebunden ist. Ein hoher Acetyl-CoA-Spiegel signalisiert den Bedarf für mehr Oxalacetat. Damit sind im Mitochondrium von *T. gondii* zwei Enzyme lokalisiert, für deren Funktion die Anwesenheit von Acetyl-CoA essenziell ist, und die um dieses Substrat konkurrieren: Die *Pyruvat-Carboxylase* und die *Citratsynthase*.

Die durch die *Pyruvat-Carboxylase* katalysierte Oxalacetat-Synthese gehört zu der Gluconeogenese, bei dem ausgehend von Pyruvat Glukose aufgebaut wird, und deren folgender Schritte dieser Biosynthese typischerweise im Zytosol ablaufen. Der Transport des Oxalacetat erfolgt dabei normalerweise über Malat, das anschließend ins Zytosol transportiert wird und dort von einer zytosolischen *Malat-Dehydrogenase* wieder in Oxalacetat umgewandelt wird. Dieser Weg ist in *Toxoplasma* allerdings nicht möglich, da diese Isoform der MDH nicht existiert.

Die für die Phosphorylierung des gebildeten Oxalacetats notwendige *PEP-Carboxykinase*, der zweite Schritt der Gluconeogenese, kommt in zwei Isoformen vor, von denen eine im Zytosol und die zweite bisher nicht lokalisiert werden konnte. *In silico*-Analysen zeigten, dass auch die zweite Isoform kein Transportsignal trägt und somit eine Zytosolische Lokalisierung nahe liegt. Die Aufgabe dieser beiden PEP-Carboxykinasen im Zytosol konnte abschließend nicht

geklärt werden. Das für sie benötigte Substrat kann nicht über die bekannten Shuttle-Wege bereitgestellt werden, Ob Oxalacetat direkt über die mitochondrialen Membranen transportiert werden kann, ist fraglich.

Alternative Wege für eine Umwandlung von Malat in Oxalacetat ohne die Mitwirkung einer zytosolischen *Malat-Dehydrogenase* sind nicht bekannt. Die Hypothese, dass die FAD-MDH zwar in der äußeren Membran des Mitochondrium lokalisiert ist und daher die zytosolische Reaktion katalysieren kann, lässt sich mit dem in dieser Arbeit genutzten Ansatz nicht klären. Für *Plasmodium falciparum* konnte jedoch die Lokalisierung der FAD-abhängigen MDH innerhalb des Mitochondrium eindeutig gezeigt werden (Uyemura *et al.*, 2004).

Abb. 31 zeigt das hypothetische Modell für die Funktion des TCA-Zyklus in *T. gondii*, wie er nach den hier diskutierten Ergebnissen funktionieren könnte.

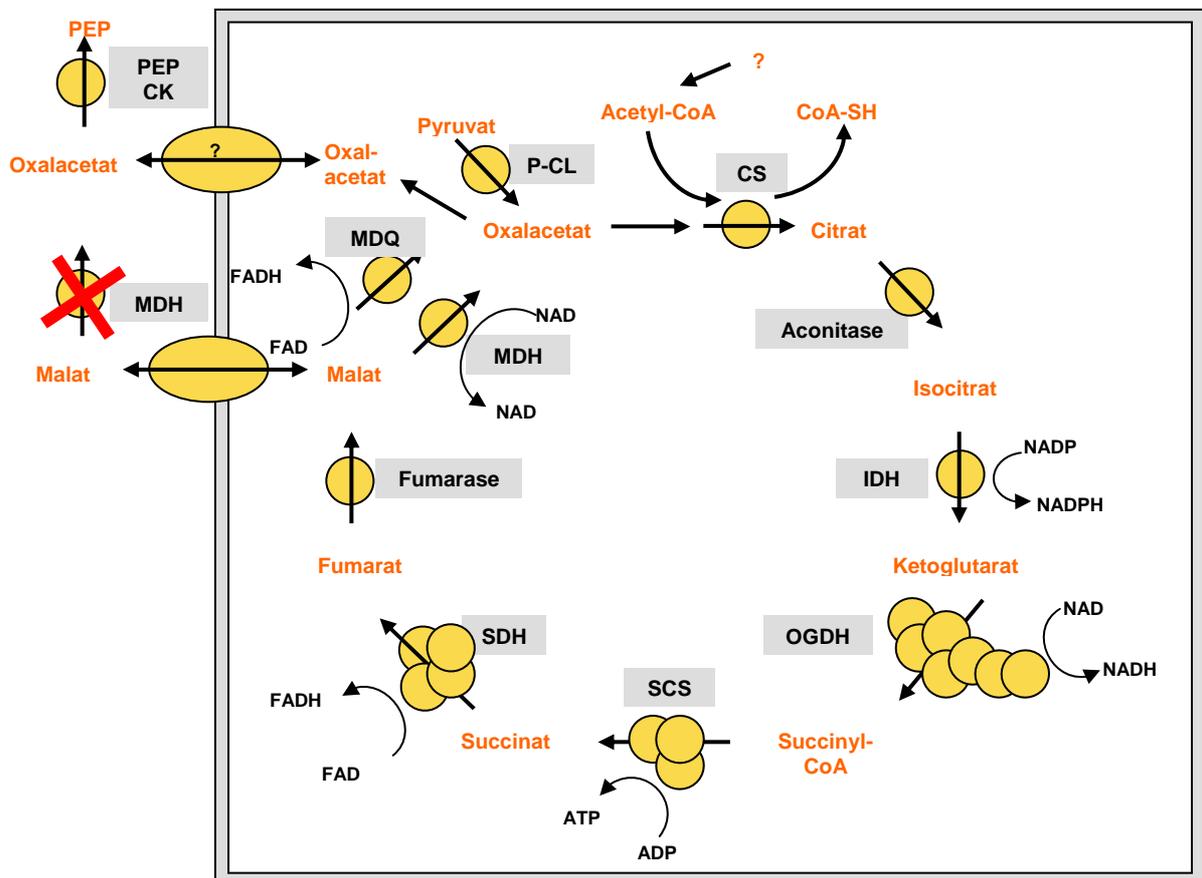


Abb. 31: TCA-Zyklus im Mitochondrium von *T. gondii*. Die in dieser Arbeit identifizierten Enzyme, die Produkte sowie die benötigten Co-Faktoren sind dargestellt. CS Citratsynthase; IDH Isocitrat-Dehydrogenase; OGDH α -Ketoglutarat-Dehydrogenase; SCS Succinyl-CoA-Synthetase; SDH Succinat-Dehydrogenase; MDQ FAD abhängige Malat-Dehydrogenase; MDH Malat-Dehydrogenase; P-CL Pyruvat-Carboxylase; PEP-CK Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase

5. Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit der nahezu jede eukaryotische, kernhaltige Zelle invadieren und in ihr replizieren kann. Im Zwischenwirt kommt *T. gondii* in zwei unterschiedlichen Stadien vor, während der akuten Infektion als schnell replizierender Tachyzoite sowie nach dem Einsetzen der Immunantwort als chronische Dauerform des Bradyzoiten. Diese Bradyzoiten bilden Zysten die nicht vom Immunsystem erkannt werden, so dass der Parasit auf diese Weise lebenslang in seinem Zwischenwirt persistieren kann.

Die unterschiedliche Expression der Isoformen der *Enolase* und *Lactat-Dehydrogenase* in den beiden Stadien führten zu der Hypothese, dass *T. gondii* unterschiedliche Ansprüche an seinen Kohlenhydrat-Metabolismus hat. Ebenso war die Anwesenheit eines TCA-Zyklus im einzigen Mitochondrium des Parasiten in Frage gestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Kompartimentierung des Kohlenhydrat-Stoffwechsels in *Toxoplasma gondii* untersucht werden, wobei insbesondere die Zuordnung einzelner Isoenzyme zu Apicoplast, Mitochondrium und Zytosol im Vordergrund standen.

Die Lokalisationen der in dieser Arbeit identifizierten Isoenzyme der Glykolyse, eines vollständigen Zitronensäure-Zyklus sowie weiterer, diesen Stoffwechselwegen angegliederter Enzyme, erfolgte mit Hilfe des Immunfluoreszenztests. Dabei wurde *T. gondii* stabil mit Plasmiden transfiziert die für Fusionsproteine kodierten, bei denen der Vollständige oder Teile des Offenen-Leserahmen mit einem myc-tag fusioniert waren. Alternativ erfolgte die Lokalisierung mit Hilfe von Antiserum gegen rekombinante Proteine.

Der einzige im Genom von *T. gondii* kodierte *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex* konnte mit Hilfe des Immunfluoreszenztests, sowohl durch die Verwendung von myc-tag Fusionsproteinen, wie auch mit Antiserum gegen rekombinante Enzyme, ausschließlich im Apicoplasten und nicht im Mitochondrium lokalisiert werden. Seine Anwesenheit im Apicoplasten erklärt den Ursprung des Acetyl-CoAs, welches für die Fettsäuresynthese in diesem Organell benötigt wird. Auch die in dieser Arbeit identifizierten Isoenzyme der *Pyruvat-Kinase*, *Triosephosphat-Isomerase* und *Phosphoglycerat-Kinase* wurden mittels Epitop-tagging im Immunfluoreszenztest im Apicoplasten lokalisiert. Ein Triosephosphat-Translocator konnte ebenfalls dem Apicoplasten zugeordnet werden. Diese Enzyme stellen unter anderem essenzielle Vorstufen für die Biosynthese von Isoprenoiden und Phospholipiden zur Verfügung. Zusammen mit der in der Literatur beschriebenen plastidischen Isoform der *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* konnte das folgende

Teilmodell des C-Metabolismus im Apicoplasten entwickelt werden: Die lokalisierten Enzyme stellen eine partielle Kopie der Glykolyse im Apicoplasten dar und katalysieren die Reaktionen bei denen sowohl Energie als auch Reduktionsäquivalente gebildet werden. Durch den Import von Dihydroxyacetonphosphat in den Apicoplasten und den Export des reduzierten 3-Phosphoglycerats in das Zytosol steht dem Apicoplasten somit Reduktionsäquivalente und Energie (ATP) für Biosynthesewege zur Verfügung.

Durch die ausschließlich plastidische Lokalisierung des *Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes* und dem daraus resultierenden Verlust der natürlichen Acetyl-CoA-Quelle, wurde die Funktionalität des TCA-Zyklus im Mitochondrium in Frage gestellt. Im Genom konnten allerdings sämtliche Gene für einen kompletten TCA-Zyklus identifiziert und mit myc-tag-Fusionsproteinen die Lokalisierung dieser Enzyme im Mitochondrium gezeigt werden. Die Anwesenheit der Enzyme des TCA-Zyklus im Mitochondrium, sowie einer für den Parasiten essenziellen Atmungskette lassen auf einen vollständigen Zyklus schließen.

Eine funktionelle Untersuchung des Zitronensäure-Zyklus erfolgte durch die Generierung einer konditionellen Knock-out-Mutante der *Succinyl-CoA-Synthetase*. Nach der Integration einer zusätzlichen Kopie unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wurde der endogene Genlocus durch homologe Integration zerstört. Da die Unterbrechung des TCA-Zyklus nicht zu einem letalen Phänotyp führte, scheint ein vollständiger TCA-Zyklus nicht essenziell zu sein. Eine Analyse des Phänotyps zeigte allerdings eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit der Knock-out-Mutante im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten. Durch die Zugabe von externem Succinat konnte der Phänotyp wieder komplementiert werden.

Das für einen funktionellen TCA-Zyklus benötigte Acetyl-CoA könnte durch den Abbau von verzweigten Aminosäuren bereitgestellt werden. Ein dafür essenzielles Enzym, die „*Branched-Chain*“ *Oxoglutarat-Dehydrogenase* konnte ebenfalls im Mitochondrium mit Fusionsproteinen lokalisiert werden.

6. Summary

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite and which is able to infect and replicate within nearly any eukaryotic, nucleated cell. In the intermediate host the parasite occurs in two different stages, during the acute infection as the fast replicating tachyzoite and after the immune response, during the chronic phase of the infection, as a nearly dormant bradyzoite. These bradyzoites produce a cyst wall which can not be detected by the immune system. As a bradyzoite, the parasite persists lifelong in his intermediate host.

The two known isoforms of *enolase* and *lactate-dehydrogenase* are differently expressed during stage conversion and leads to the hypothesis that the parasite has a different need of its C-metabolism. It is also questionable, whether the parasite's mitochondrion harbours a complete TCA-cycle.

The aim of this thesis was to examine the compartementation of the C-metabolic pathways in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, with special focus on the localization of the different isoenzymes in the mitochondria, cytosol and apicoplast.

The localization of the identified glycolytic isoenzymes, all enzymes needed for a complete TCA-cycle as well as several enzymes of associated pathways was performed using immunofluorescence staining. The parasite was stably transfected with a plasmid containing the complete or partial open reading frame of the corresponding gene followed by a myc-tag, which allowed to detect the produced fusion proteins with myc-tag specific antibodies. As an alternative approach polyclonal antisera were produced to confirm the localization of some proteins.

Only one PDH-complex is encoded in the genome and all subunits could be recognized in the apicoplast exclusively by indirect immunofluorescence staining and was confirmed with the polyclonal antisera. The presence of the PDH-complex inside the apicoplast explains how the acetyl-CoA for the type II fatty acid biosynthesis in the apicoplast is provided. In addition, isoenzymes of the *pyruvate-kinase*, *triosphosphate-isomerase* and *phosphoglycerate-kinase* could be localized to the apicoplast via indirect immunofluorescence staining. A triosephosphate-translocator was also found to be localized to the apicoplast. All these enzymes provide essential substrates for the biosynthesis of isoprenoids and phospholipids. Together with the previously described plastidic isoform of the *glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase* a new metabolic model for parts of the apicoplast metabolism could be developed. These plastidic isoforms of the glycolytic pathway are connected and catalyse the

reaction during which reduction power and energy is produced. After the import of dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) by the trisioephosphate-translocator DHAP is reduced to 3-phosphoglycerate in 3 steps in which NAD(P)H and ATP are produced and at the end 3-phosphoglycerate is exported back into the cytosol to be used for further reactions in the glycolytic pathway.

Due to the absence of the PDH-complex in the mitochondria and thus the loss of the natural acetyl-CoA source for the TCA-cycle, it was unclear whether there was a functional TCA-cycle in the mitochondria or not. The genome of *Toxoplasma gondii* encodes all enzymes needed for a complete TCA-cycle and they could all be localized to the mitochondria by immunofluorescence. The presence of all these enzymes and a complete respiratory chain leads to assume a complete cycle.

A functional characterisation of the TCA-cycle was done by the construction of a conditional knock-out mutant of the *succinyl-CoA-synthetase alpha subunit*. After the integration of an additional copy under the control of a tetracycline inducible promoter, the endogenous locus of this gene was destroyed by homologous integration of a knock-out plasmid. The disruption of the TCA-cycle does not lead to a lethal phenotype. Thus it seems that a complete cycle is not essential for the survival of the parasite. Further analysis of the knock out mutant showed a reduced growth rate in comparison to the wild type. The addition of external succinate to the media led to a complementation of the phenotype.

However, for a functional TCA-cycle the presence of acetyl-CoA is absolutely essential. Acetyl-CoA might be provided by the degradation of branched amino acid, which is supported by the fact that an essential enzyme, the branched-chain *oxoglutarate dehydrogenase*, could also be identified and localized to the mitochondria.

7. Literaturverzeichnis

- Ajzenberg, D., Banuls, A.L., Su, C., Dumetre, A., Demar, M., Carme, B. and Darde, M.L. (2004) Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, **34**, 1185-1196.
- Al-Anouti, F. and Ananvoranich, S. (2002) Comparative analysis of antisense RNA, double-stranded RNA, and delta ribozyme-mediated gene regulation in *Toxoplasma gondii*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **12**, 275-281.
- Ambroise-Thomas, P. and Pelloux, H. (1993) Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol Today*, **9**, 61-63.
- Ancelin, M.L., Calas, M., Vidal-Sailhan, V., Herbute, S., Ringwald, P. and Vial, H.J. (2003) Potent inhibitors of Plasmodium phospholipid metabolism with a broad spectrum of in vitro antimalarial activities. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2590-2597.
- Bahl, A., Brunk, B., Crabtree, J., Fraunholz, M.J., Gajria, B., Grant, G.R., Ginsburg, H., Gupta, D., Kissinger, J.C., Labo, P., Li, L., Mailman, M.D., Milgram, A.J., Pearson, D.S., Roos, D.S., Schug, J., Stoeckert, C.J., Jr. and Whetzel, P. (2003) PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Res*, **31**, 212-215.
- Bao, X., Focke, M., Pollard, M. and Ohlrogge, J. (2000) Understanding in vivo carbon precursor supply for fatty acid synthesis in leaf tissue. *Plant J*, **22**, 39-50.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, **340**, 783-795.
- Bisanz, C., Bastien, O., Grando, D., Jouhet, J., Marechal, E. and Cesbron-Delauw, M.F. (2006) *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J*, **394**, 197-205.
- Bohne, W., Heesemann, J. and Gross, U. (1993) Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun*, **61**, 1141-1145.
- Bohne, W., Heesemann, J. and Gross, U. (1994) Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun*, **62**, 1761-1767.
- Borst, P., Overdulve, J.P., Weijers, P.J., Fase-Fowler, F. and Van den Berg, M. (1984) DNA circles with cruciforms from *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*. *Biochim Biophys Acta*, **781**, 100-111.

- Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B. and Marion, S.A. (1997) Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet*, **350**, 173-177.
- Claros, M.G. (1995) MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Comput Appl Biosci*, **11**, 441-447.
- Dao, A., Soete, M., Sergent, V., Deslee, D., Fortier, B. and Dubremetz, J.F. (2002) Potential of beta-galactosidase-expressing *Toxoplasma gondii* for in situ localization and observation of rare stages of the parasite life cycle. *Parasitol Res*, **88**, 69-72.
- Denton, H., Brown, S.M., Roberts, C.W., Alexander, J., McDonald, V., Thong, K.W. and Coombs, G.H. (1996) Comparison of the phosphofructokinase and pyruvate kinase activities of *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella* and *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, **76**, 23-29.
- Denton, H., Roberts, C.W., Alexander, J., Thong, K.W. and Coombs, G.H. (1996) Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Lett*, **137**, 103-108.
- DeRocher, A., Hagen, C.B., Froehlich, J.E., Feagin, J.E. and Parsons, M. (2000) Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the *Toxoplasma gondii* plastid branches off the secretory system. *J Cell Sci*, **113** (Pt 22), 3969-3977.
- 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**, 14010-14019.
- 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**, 11703-11707.
- 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**, 243-253.
- 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**, 5749-5753.
- 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**, 267-299.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V. and Fourmaux, M.N. (1998) Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol*, **28**, 1007-1013.

- Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Dendouga, N., Popescu, O. and Tomavo, S. (2001) Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Mol Biol*, **309**, 1017-1027.
- Dzierszinski, F., Popescu, O., Toursel, C., Slomianny, C., Yahiaoui, B. and Tomavo, S. (1999) The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans. *J Biol Chem*, **274**, 24888-24895.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. and von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci*, **8**, 978-984.
- Ferguson, D.J., Hutchison, W.M. and Pettersen, E. (1989) Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Parasitol Res*, **75**, 599-603.
- Ferguson, D.J., Parmley, S.F. and Tomavo, S. (2002) Evidence for nuclear localisation of two stage-specific isoenzymes of enolase in *Toxoplasma gondii* correlates with active parasite replication. *Int J Parasitol*, **32**, 1399-1410.
- Fichera, M.E. and Roos, D.S. (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*, **390**, 407-409.
- Foth, B.J., Stimmler, L.M., Handman, E., Crabb, B.S., Hodder, A.N. and McFadden, G.I. (2005) The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast. *Mol Microbiol*, **55**, 39-53.
- Frenkel, J.K. (1988) Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today*, **4**, 273-278.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P. and Miller, N.L. (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, **167**, 893-896.
- Freyre, A., Dubey, J.P., Smith, D.D. and Frenkel, J.K. (1989) Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol*, **75**, 750-755.
- Funes, S., Davidson, E., Reyes-Prieto, A., Magallon, S., Herion, P., King, M.P. and Gonzalez-Halphen, D. (2002) A green algal apicoplast ancestor. *Science*, **298**, 2155.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. and Barrell, B. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**, 498-511.

- Gardner, M.J., Williamson, D.H. and Wilson, R.J. (1991) A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. *Mol Biochem Parasitol*, **44**, 115-123.
- Gleeson, M.T. (2000) The plastid in Apicomplexa: what use is it? *Int J Parasitol*, **30**, 1053-1070.
- Gornicki, P. (2003) Apicoplast fatty acid biosynthesis as a target for medical intervention in apicomplexan parasites. *Int J Parasitol*, **33**, 885-896.
- Grigg, M.E. and Boothroyd, J.C. (2001) Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *J Clin Microbiol*, **39**, 398-400.
- Groß, U. (1994). Toxoplasmose. Immunologische und molekulare Parasitologie. M. Röllinghoff, M. Rommel. Jena, Gustav Fischer Verlag, 83-103.
- Gross, U. and Bohne, W. (1994) *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation. *J Eukaryot Microbiol*, **41**, 10S-11S.
- Gubbels, M.J. and Striepen, B. (2004) Studying the cell biology of apicomplexan parasites using fluorescent proteins. *Microsc Microanal*, **10**, 568-579.
- Gubbels, M.J., Wieffer, M. and Striepen, B. (2004) Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol*, **137**, 99-110.
- Gupta, N., Zahn, M.M., Coppens, I., Joiner, K.A. and Voelker, D.R. (2005) Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem*, **280**, 16345-16353.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S., GRIFFITH, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* (NY) **10**: 413-417
- Hodges, M., Yikilmaz, E., Patterson, G., Kasvosve, I., Rouault, T.A., Gordeuk, V.R. and Loyevsky, M. (2005) An iron regulatory-like protein expressed in *Plasmodium falciparum* displays aconitase activity. *Mol Biochem Parasitol*, **143**, 29-38.
- Ho-Yen, D.O., Joss, A.W. and Chatterton, J.M. (1992) Congenital toxoplasmosis. *Bmj*, **305**, 651-652.
- Hu, K., Roos, D.S. and Murray, J.M. (2002) A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol*, **156**, 1039-1050.
- Jelenska, J., Crawford, M.J., Harb, O.S., Zuther, E., Haselkorn, R., Roos, D.S. and Gornicki, P. (2001) Subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2723-2728.

- Johnson, J.D., Mehus, J.G., Tews, K., Milavetz, B.I. and Lambeth, D.O. (1998) Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes. *J Biol Chem*, **273**, 27580-27586.
- Johnson, J.D., Muhonen, W.W. and Lambeth, D.O. (1998) Characterization of the ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in pigeon. The enzymes incorporate the same alpha-subunit. *J Biol Chem*, **273**, 27573-27579.
- Joiner, W.J., Khanna, R., Schlichter, L.C. and Kaczmarek, L.K. (2001) Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Biol Chem*, **276**, 37980-37985.
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., Soldati, D. and Beck, E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, **285**, 1573-1576.
- Kavanagh, K.L., Elling, R.A. and Wilson, D.K. (2004) Structure of *Toxoplasma gondii* LDH1: active-site differences from human lactate dehydrogenases and the structural basis for efficient APAD⁺ use. *Biochemistry*, **43**, 879-889.
- Ke, J., Behal, R.H., Back, S.L., Nikolau, B.J., Wurtele, E.S. and Oliver, D.J. (2000) The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coenzyme A synthetase in fatty acid synthesis in developing Arabidopsis seeds. *Plant Physiol*, **123**, 497-508.
- Kim, K., Soldati, D. and Boothroyd, J.C. (1993) Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science*, **262**, 911-914.
- Kim, K. and Weiss, L.M. (2004) *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*, **34**, 423-432.
- Kissinger, J.C., Gajria, B., Li, L., Paulsen, I.T. and Roos, D.S. (2003) ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acids Res*, **31**, 234-236.
- 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. *Science*, **275**, 1485-1489.
- Kyhse-Andersen (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Blagburn, B.L. and Toivio-Kinnucan, M. (1991) Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol*, **77**, 126-132.

- Ling, Y., Sahota, G., Odeh, S., Chan, J.M., Araujo, F.G., Moreno, S.N. and Oldfield, E. (2005) Bisphosphonate inhibitors of *Toxoplasma gondii* growth: in vitro, QSAR, and in vivo investigations. *J Med Chem*, **48**, 3130-3140.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* **193**, 265-275.
- Luft, B.J., Hafner, R., Korzun, A.H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E.M., Bourland, D.D., 3rd, Uttamchandani, R., Fuhrer, J., Jacobson, J. and et al. (1993) Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. *N Engl J Med*, **329**, 995-1000.
- Luft, B.J. and Remington, J.S. (1992) Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*, **15**, 211-222.
- Lundberg, K.S., Schoemaker, D.D., Adams, M.W.W., Short, J.M., Sorge, J.A., Marthur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA Polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**: 1-6.
- Maeda, T., Saito, T., Oguchi, Y., Nakazawa, M., Takeuchi, T. and Asai, T. (2003) Expression and characterization of recombinant pyruvate kinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Parasitol Res*, **89**, 259-265.
- Marechal, E. and Cesbron-Delauw, M.F. (2001) The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci*, **6**, 200-205.
- Meissner, M., Brecht, S., Bujard, H. and Soldati, D. (2001) Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res*, **29**, E115.
- Meissner, M., Schluter, D. and Soldati, D. (2002) Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science*, **298**, 837-840.
- Messina, M., Niesman, I., Mercier, C. and Sibley, L.D. (1995) Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using phleomycin selection. *Gene*, **165**, 213-217.
- Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M. and Sibley, L.D. (1999) Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med*, **190**, 1783-1792.
- Morisaki, J.H., Heuser, J.E. and Sibley, L.D. (1995) Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci*, **108** (Pt 6), 2457-2464.
- Muller, S. (2004) Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, **53**, 1291-1305.

- Mullin, K.A., Lim, L., Ralph, S.A., Spurck, T.P., Handman, E. and McFadden, G.I. (2006) Membrane transporters in the relict plastid of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9572-9577.
- Nakaar, V., Ngo, E.O. and Joiner, K.A. (2000) Selection based on the expression of antisense hypoxanthine-xanthine-guanine-phosphoribosyltransferase RNA in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, **110**, 43-51.
- Nakaar, V., Samuel, B.U., Ngo, E.O. and Joiner, K.A. (1999) Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *J Biol Chem*, **274**, 5083-5087.
- Nicolle, C., Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. **148**, 369-372.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst*, **8**, 581-599.
- Ohlrogge, J., Pollard, M., Bao, X., Focke, M., Girke, T., Ruuska, S., Mekhedov, S. and Benning, C. (2000) Fatty acid synthesis: from CO₂ to functional genomics. *Biochem Soc Trans*, **28**, 567-573.
- Pandini, V., Caprini, G., Thomsen, N., Aliverti, A., Seeber, F. and Zanetti, G. (2002) Ferredoxin-NADP⁺ reductase and ferredoxin of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* interact productively in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem*, **277**, 48463-48471.
- Parmley, S.F., Weiss, L.M. and Yang, S. (1995) Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol Biochem Parasitol*, **73**, 253-257.
- Peng, Z.Y. and Mansour, T.E. (1992) Purification and properties of a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, **54**, 223-230.
- Perozzo, R., Kuo, M., Sidhu, A.S., Valiyaveetil, J.T., Bittman, R., Jacobs, W.R., Jr., Fidock, D.A. and Sacchettini, J.C. (2002) Structural elucidation of the specificity of the antibacterial agent triclosan for malarial enoyl acyl carrier protein reductase. *J Biol Chem*, **277**, 13106-13114.
- Prigge, S.T., He, X., Gerena, L., Waters, N.C. and Reynolds, K.A. (2003) The initiating steps of a type II fatty acid synthase in *Plasmodium falciparum* are catalyzed by pfACP, pfMCAT, and pfKASIII. *Biochemistry*, **42**, 1160-1169.
- Ralph, S.A., van Dooren, G.G., Waller, R.F., Crawford, M.J., Fraunholz, M.J., Foth, B.J., Tonkin, C.J., Roos, D.S. and McFadden, G.I. (2004) Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 203-216.
- Rawsthorne, S. (2002) Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Prog Lipid Res*, **41**, 182-196.

- Remington, J. S., Desmonts, G. (1990). Toxoplasmosis. In: Remington, J. S. and J. O. Klein (eds.): Infectious diseases of the fetus and newborn infant. W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 89-195.
- Roos, D.S., Crawford, M.J., Donald, R.G., Kissinger, J.C., Klimczak, L.J. and Striepen, B. (1999) Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 426-432.
- Roos, D.S., Donald, R.G., Morrissette, N.S. and Moulton, A.L. (1994) Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol*, **45**, 27-63.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, GT, Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.40.
- Schnarrenberger, C. and Martin, W. (2002) Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer. *Eur J Biochem*, **269**, 868-883.
- Scholtyssek, E. and Piekarski, G. (1965) [Electron microscopic studies on merozoites of *Eimeria* (*Eimeria perforans* and *E. stidae*) and *Toxoplasma gondii*. On the systematic position of *T. gondii*]. *Z Parasitenkd*, **26**, 91-115.
- Seeber, F. (2002) Biogenesis of iron-sulphur clusters in amitochondriate and apicomplexan protists. *Int J Parasitol*, **32**, 1207-1217.
- Seeber, F. (2002) Eukaryotic genomes contain a [2Fez.sbn;2S] ferredoxin isoform with a conserved C-terminal sequence motif. *Trends Biochem Sci*, **27**, 545-547.
- 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.
- Sibley, L.D. (1995) Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol*, **5**, 129-132.
- 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**, 5508-5512.
- Sibley, L.D., Weidner, E. and Krahenbuhl, J.L. (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*, **315**, 416-419.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F. and Lurin, C. (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, **4**, 1581-1590.

- Soete, M., Camus, D. and Dubremetz, J.F. (1994) Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp Parasitol*, **78**, 361-370.
- Soldati, D. and Boothroyd, J.C. (1993) Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science*, **260**, 349-352.
- Soldati, D., Kim, K., Kampmeier, J., Dubremetz, J.F. and Boothroyd, J.C. (1995) Complementation of a *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection. *Mol Biochem Parasitol*, **74**, 87-97.
- 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**, 325-338.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R. and Weiss, L.M. (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, **30**, 1217-1258.
- Thomsen-Zieger, N., Pandini, V., Caprini, G., Aliverti, A., Cramer, J., Selzer, P.M., Zanetti, G. and Seeber, F. (2004) A single in vivo-selected point mutation in the active center of *Toxoplasma gondii* ferredoxin-NADP⁺ reductase leads to an inactive enzyme with greatly enhanced affinity for ferredoxin. *FEBS Lett*, **576**, 375-380.
- Tomavo, S. and Boothroyd, J.C. (1995) Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, **25**, 1293-1299.
- Uyemura, S.A., Luo, S., Vieira, M., Moreno, S.N. and Docampo, R. (2004) Oxidative phosphorylation and rotenone-insensitive malate- and NADH-quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelii yoelii* mitochondria in situ. *J Biol Chem*, **279**, 385-393.
- van Dijk, M.R., Janse, C.J. and Waters, A.P. (1996) Expression of a *Plasmodium* gene introduced into subtelomeric regions of *Plasmodium berghei* chromosomes. *Science*, **271**, 662-665.
- van Dooren, G.G., Stimmler, L.M. and McFadden, G.I. (2006) Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev*, **30**, 596-630.
- van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R. and Tielens, A.G. (2005) The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans*, **33**, 967-971.
- van Poppel, N.F., Welagen, J., Duisters, R.F., Vermeulen, A.N. and Schaap, D. (2006) Tight control of transcription in *Toxoplasma gondii* using an alternative tet repressor. *Int J Parasitol*, **36**, 443-452.

- van Weelden, S.W., van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R. and Tielens, A.G. (2005) New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle. *J Biol Chem*, **280**, 12451-12460.
- Vercesi, A.E., Rodrigues, C.O., Uyemura, S.A., Zhong, L. and Moreno, S.N. (1998) Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, **273**, 31040-31047.
- Vollmer, M., Thomsen, N., Wiek, S. and Seeber, F. (2001) Apicomplexan parasites possess distinct nuclear-encoded, but apicoplast-localized, plant-type ferredoxin-NADP+ reductase and ferredoxin. *J Biol Chem*, **276**, 5483-5490.
- Waller, K.L., Cooke, B.M., Nunomura, W., Mohandas, N. and Coppel, R.L. (1999) Mapping the binding domains involved in the interaction between the *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand P. *falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J Biol Chem*, **274**, 23808-23813.
- 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**, 12352-12357.
- Waller, R.F., Keeling, P.J., van Dooren, G.G. and McFadden, G.I. (2003) Comment on "A green algal apicoplast ancestor". *Science*, **301**, 49; author reply 49.
- Weber, K., Pringle, J. R., Osborn, M. (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol.* **26**, 3-27
- Wilson, R.J. and Williamson, D.H. (1997) Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 1-16.
- Wrenger, C. and Muller, S. (2003) Isocitrate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*, **270**, 1775-1783.
- Yang, S. and Parmley, S.F. (1995) A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase. *Mol Biochem Parasitol*, **73**, 291-294.
- Yang, S. and Parmley, S.F. (1997) *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts. *Gene*, **184**, 1-12.
- Zuther, E., Johnson, J.J., Haselkorn, R., McLeod, R. and Gornicki, P. (1999) Growth of *Toxoplasma gondii* is inhibited by aryloxyphenoxypropionate herbicides targeting acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13387-13392.

Kongressbeiträge

Fleige, T., Gross, U., Bohne, W. Identification of bradyzoite specific genes. 1. PhD Workshop for Young Parasitologist der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, 14.–17. März 2004, Würzburg

Fleige, T., Saleh, A., Gross, U., Bohne, W. Regulation of TCA-genes during stage conversion of *Toxoplasma gondii*. First COST 857 PhD Retreat, 12.–14. September 2004, Brüssel

Fleige, T., Saleh, A., Gross, U., Bohne, W. Transcriptional regulation and localization of genes associated with C-metabolism in *Toxoplasma gondii*. 2. Gemeinsamer Kongress von DGHM und VAAM, 25.–28. September 2005, Göttingen

Fleige, T., Saleh, A., Gross, U., Bohne, W. Localisation of glycolytic and TCA-cycle associated enzymes in *Toxoplasma gondii*. 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, 22.–25. Februar 2006, Wien, Österreich

Fleige, T., Gross, U. Molecular Biology. First International Seminar and Workshop for establishing a Tropical Medicine and Molecular Biology Center in Banda Aceh Indonesia, 25.–28. März 2006, Banda Aceh, Indonesien

Fleige, T., Gross, U. Establishing a Lab for Molecular Biology. First International Seminar and Workshop for establishing a Tropical Medicine and Molecular Biology Center in Banda Aceh Indonesia, 25.–28. März 2006, Banda Aceh, Indonesien

Fleige, T., Saleh, A., Bohne, W. Compartmentalization of the C-metabolism in *Toxoplasma gondii*. International Conference: Cell organells of Protozoan Parasites: From Basic Science to Drug Targets, 04.–07. Juni 2006, Prag Tschechien

Fleige, T., Gross, U., Bohne, W. Compartementation of metabolic pathways in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. 17. Molecular Parasitology Meeting, 10.–14. Spetember 2006, Woods Hole, USA

Veröffentlichungen

Fleige, T., Gross, U., Bohne, W. (2006). A proposed reverse phosphoglycerate shuttle in the apicoplast of *T. gondii* as a mechanism to generate reduction power and ATP for fatty acid synthesis. *Mol Microbiol (submitted)*

Fleige, T., Gross, U., Bohne, W. (2006). Characterisation of a *Succinyl-CoA-Synthetase* konditional KO-Mutant and the function of the TCA-Cycle in *T. gondii* (*in preparation*)

Lebenslauf

Tobias Fleige

- Geburtsdatum:** 10.10.1975
- Geburtsort:** Hildesheim
- Familienstand:** ledig
- Nationalität:** deutsch
- Schule:** 1982 – 1986 Bernward Grundschule Hildesheim
1986 – 1988 Orientierungsstufe St. Augustinus-Schule Hildesheim
1988 – 1992 Albertus-Magnus-Realschule Hildesheim
1992 – 1995 Scharnhorst Gymnasium Hildesheim
- Bundeswehr:** 1995 – 1996 Wehrdienst in Hildesheim
- Studium:** 1996 – 1998 Studium Diplomingenieur (FH) Biotechnologie,
Fachbereich Verfahrenstechnik, Fachhochschule Bingen am Rhein

1998 – 2002 Studium Biologie (Diplom), Universität Kaiserslautern
Dezember 1999 Diplom-Vorprüfung
November 2001 Diplom-Hauptprüfung

Januar 2002 – September 2002 Diplomarbeit in der Abteilung
Genetik an der Universität Kaiserslautern unter Anleitung von Prof.
Dr. J. A. Cullum mit dem Thema: Genomvariabilität von
Mycobacterium tuberculosis
- Promotion:** Seit Januar 2003 Promotion bei Prof. Dr. Uwe Groß, Institut für
Medizinische Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen
über das Thema: Kompartimentalisierung des Kohlenhydrat-
Stoffwechsels in *Toxoplasma gondii*