

**Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-
Aktivierung durch *Toxoplasma gondii* *in vitro* und
in vivo: molekulare Mechanismen und parasitäre
Effektormoleküle**

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

KRISTIN GRAUMANN

aus Güstrow

- Göttingen 2012-

Mitglieder des Betreuungsausschusses:

Referent: Prof. Dr. Uwe Groß

Koreferent: Prof. Dr. Gerhard Braus

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2012

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Anleiter, Prof. Dr. Carsten Lüder für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, die stetige Unterstützung, die wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen, seine Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit an diesem interessanten Projekt arbeiten zu dürfen.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Uwe Groß für die interessanten und wertvollen Anregungen während meiner Jahresberichte und für die Übernahme des Referats meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Braus möchte ich für die Übernahme des Koreferats und für die hilfreichen Diskussionen während meiner Fortschrittsberichte danken.

Mein Dank gilt außerdem den weiteren Mitgliedern meines Prüfungskomitees Prof. Dr. Martin Göpfert, Prof. Dr. Ernst Wimmer, Prof. Dr. Rolf Daniel und PD Dr. Michael Hoppert.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Takashi Asai für die freundliche Bereitstellung der NTPase I aus dem Kyoto Institut für Technologie, Japan.

Bei Frau Dr. Susanne Eschenburg und Herrn Dr. Thomas Reubold, Hannover möchte ich mich besonders für die Durchführung der Aktivitätstests in dem rekonstituierten *in vitro*-System der Caspase 9-Aktivierung und die hilfreichen Gespräche bedanken.

Ein großer Dank geht an Herrn PD Dr. Volker Heussler, Hamburg und Dr. Con Beckers, Chapel Hill, NC für die freundliche Überlassung des anti-HSP70 Antikörpers und des anti-NTPase-Serums.

Ein lieber Dank geht an alle meine Laborkollegen im „Institut für Medizinische Mikrobiologie“ für die freundliche Atmosphäre und die schöne Zeit im Labor. An alle, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

All meinen Freunden möchte ich für ihre mentale Unterstützung, ihren stets vorhandenen Rückhalt und für die Aufmunterung an trüben Tagen von ganzem Herzen danken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester für ihre großartige Unterstützung, ihren unermüdlichen Zuspruch und ihren Glauben an mich bedanken. Ohne sie wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Der Parasit <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1 Der Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	3
1.1.2 Bedeutung für den Menschen	4
1.1.3 Übertragung von <i>T. gondii</i>	5
1.2 Parasit-Wirt-Interaktion	6
1.2.1 Immunabwehr	6
1.2.2 Immunevasionsmechanismen	8
1.3 Apoptose	8
1.3.1 Morphologische Veränderung der Zelle während der Apoptose	10
1.3.2 Molekularbiologie der Apoptose	10
1.3.3 Der extrinsische Signalweg der Apoptose	11
1.3.4 Der intrinsische Signalweg der Apoptose	12
1.3.5 Inhibierung der Wirtszellapoptose durch <i>T. gondii</i>	14
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Material	17
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2 Lösungen und Chemikalien	18
2.1.3 Vektoren und Konstrukte	23
2.1.4 Geräte	24
2.1.5 Kits	25
2.1.6 Lebendes Material	25
2.1.7 Antikörper	26
2.1.8 Primer	28
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkulturarbeiten	30
2.2.2 Herstellung von <i>Toxoplasma</i> -Lysat	32
	II

2.2.3	Elektroporation von Jurkat Zellen	33
2.2.4	Herstellung von Proteinlysaten aus Säugerzellen	34
2.2.5	Caspase-Aktivitätstest	37
2.2.6	Rekonstituiertes Testsystem (Reubold et al., 2009)	39
2.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	40
2.2.8	Coomassie-Färbung	41
2.2.9	Western Blot	41
2.2.10	Entfernung gebundener Antikörper	43
2.2.11	Immunodepletion	43
2.2.12	Immunkopräzipitation	43
2.2.13	Immunofluoreszenztest	44
2.2.14	Transfektion	45
2.2.15	RNA-Isolierung und Reverse Transkription	46
2.2.16	Modifikation von DNA	47
2.2.17	Transformation in <i>E. coli</i>	51
2.2.18	Plasmidisolierung	51
2.2.19	Expression heterologer Proteine	51
2.2.20	Ultraschallbehandlung der Rohextrakte von <i>E. coli</i> /BL21/pQE30 und <i>E. coli</i> /BL21/TG_NTPase_pQE30	52
2.2.21	Reinigung von rekombinanten Proteinen	53
2.2.22	Entsalzung der Elutionsfraktionen	55
2.2.23	Dialyse der Elutionsfraktionen	55
2.2.24	Aufkonzentration von Elutionsfraktionen	55
2.2.25	Expression, Reinigung und Rückfaltung der funktionellen, rekombinanten NTPase (Matoba et al., 2010)	56
2.2.26	Elektronische Datenverarbeitung	56
2.2.27	Bildbearbeitung	57
2.2.28	Mikroskopie	57
3.	ERGEBNISSE	58
3.1	Interaktion von <i>Toxoplasma gondii</i> mit der Caspase 3/7-Kaskade im zellfreien System	58
3.2	Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch <i>Toxoplasma gondii</i> in infizierten Zellen	59
3.2.1	Einfluss von <i>T. gondii</i> auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität in Caspase 9-defizienten und Caspase 9-retransfizierten Zellen	59

3.2.2	Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch <i>T. gondii</i> nach Elektroporation von Jurkat-Zellen mit Cytochrom c	63
3.2.3	Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität in cytosolischen Extrakten von <i>T. gondii</i> -infizierten und nicht-infizierten Jurkat-Zellen	65
3.3	Molekulare Mechanismen zur Hemmung der Apoptosombildung	67
3.3.1	Verminderte Bindung von Procaspase 9 an APAF-1	67
3.3.2	Einfluss von <i>T. gondii</i> auf die Caspase 9-Aktivität in einem rekonstituierten <i>in vitro</i> -System der Apoptosombildung	68
3.4	Identifizierung von parasitären Effektormolekülen im zellfreien System	72
3.4.1	Caspase 3/7-Aktivität in Gegenwart von NTPase-depletiertem <i>T. gondii</i> -Lysat	72
3.4.2	Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch Vertreter aller klonalen Linien von <i>T. gondii</i>	75
3.4.3	Effekt von App(NH)p auf die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch <i>T. gondii</i>	77
3.5	Einfluss rekombinant exprimierter <i>T. gondii</i> NTPase und HSP70 auf die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase 3/7 im zellfreien System	78
3.5.1	Herstellung der rekombinanten Proteine <i>T. gondii</i> NTPase und HSP70 in <i>E. coli</i> /DH5 α Zellen	78
3.5.2	Expression der rekombinanten Proteine NTPase und HSP70	80
3.5.3	Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch Rohextrakte aus NTPase-exprimierenden <i>E. coli</i> /BL21 Zellen nach Ultraschallbehandlung	81
3.5.4	Reinigung von <i>T. gondii</i> NTPase und <i>T. gondii</i> HSP70 unter denaturierenden Bedingungen	83
3.5.5	Einfluss der denaturierend gereinigten rekombinanten Proteine <i>T. gondii</i> NTPase und <i>T. gondii</i> HSP70 auf die Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System	86
3.5.6	Reinigung von <i>T. gondii</i> HSP70 und NTPase unter nativen Bedingungen	88
3.5.7	Einfluss der rekombinanten Proteine <i>T. gondii</i> NTPase und <i>T. gondii</i> HSP70 nach Reinigung unter nativen Bedingungen auf die Caspase 3/7-Aktivierung im zellfreien System	90
3.5.8	Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System durch funktionell aktive NTPase von <i>T. gondii</i>	92
3.6	Einfluss der <i>T. gondii</i> NTPase auf die Wirtszellapoptose in menschlichen Jurkat und HeLa Zellen	95
4.	DISKUSSION	98
4.1	Interaktion von <i>Toxoplasma gondii</i> mit der Wirtszellapoptose	98

4.2 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch <i>Toxoplasma gondii</i> in infizierten Zellen	99
4.3 Hemmung der Bindung von Procaspase 9 an APAF-1 durch <i>T.gondii</i>	101
4.4 Identifizierung von parasitären Effektormolekülen	104
4.5 Die NTPase von <i>T. gondii</i> ist an der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität beteiligt	105
4.5.1 Die Hydrolase-Aktivität der NTPase spielt bei der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität keine Rolle	106
4.6 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch eine rekombinante NTPase	108
4.7 Voraussetzung für die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung durch <i>T. gondii</i> NTPase <i>in vivo</i>	112
4.8 Apoptoseinhibierung durch andere Parasiten	114
4.9 Bewertung und Bedeutung der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung durch die <i>T. gondii</i> NTPase	115
5. ZUSAMMENFASSUNG	117
6. SUMMARY	119
7. LITERATURVERZEICHNIS	121

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	„Aquired Immune Deficiency Syndrome“ (engl.)
Akt/PkB	Serin/Threonin-Kinase Akt, auch Protein Kinase B
APAF-1	“Apoptotic Protease Activation Factor 1” (engl.)
App(NH)p	Adenosin 5'-(β,γ -imido)triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
B-Zellen	Lymphozyten aus dem Knochenmark
bzw.	beziehungsweise
CARD	„Caspase Recruitment Domain“ (engl.)
CD4 ⁺ / CD8 ⁺	Zellen mit Rezeptoren für „cluster of differentiation“ 4 oder 8
cDNA	komplementäre DNA
COX	Cytochrom c Oxidase
Cyt c	Cytochrom c
Da	Dalton
DEVD-AMC	Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin
DFF	DNA Fragmentation Factor (engl.)
DISC	“Death Inducing Signaling Complex” (engl.)
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zelle
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
GRA	Dichte Granula-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guaninnukleotid-bindendes Protein

h	Stunde
H + L	Schwere und leichte Kette von Immunglobulinen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HFF	Human Foreskin Fibroblast (engl.)
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP70	Hitzeschockprotein 70
IAP	“Inhibitors of Apoptosis” (engl.)
IFN- γ	Interferon- γ
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LD _x	Letale Dosis bei der x% der Versuchsmäuse sterben
LEHD-AMC	Leu-Glu-His-Asp-aminomethylcoumarin
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	Monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex (engl.)
mRNA	„messenger Ribonucleic Acid“ (engl.)
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	Nuklear Faktor κ B
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	Nucleotid-bindende Domäne
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTPase	Nukleosidtriphosphat-Hydrolase
OligodT	Primer aus desoxy-Thyminen
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfa	Paraformaldehyd
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PV	parasitophore Vakuole
PVM	Membran der parasitophoren Vakuole
RNA	Ribonukleinsäure
ROP	Rhoprien-Protein

RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt im Roswell Park Memorial Institut
RT	Reverse Transkription
s.o.	siehe oben
SAG	„surface antigen“-Protein
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard Error Mean
Stau	Staurosporin
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
T75-Flasche	Zellkulturflasche mit 75cm ² Bodenfläche
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T-Lymphozyt	Lymphozyt aus dem Thymus
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Trp	Tryptophan
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
α	Alpha, hier: anti, gegen

1. Einleitung

1.1 Der Parasit *Toxoplasma gondii*

Im Jahre 1908 wurde von Nicolle und Manceaux in Nordafrika wie auch von Splendore in Brasilien ein bis dahin unbekannter intrazellulärer Einzeller beschrieben (Nicolle and Manceaux (2009). Seinen Namen, *Toxoplasma gondii*, erhielt er von dem nordafrikanischen Nagetier *Ctenodactylus gundi*, dem Wirtstier, aus dem er zuerst isoliert wurde, sowie in Anlehnung an seine gebogene Form (griechisch: toxon = Bogen; plasma = Form) (Black and Boothroyd, 2000). Die Art *Toxoplasma gondii* aus dem Phylum der Apikomplexa gehört zum Reich der Protozoen. Es ist ein weltweit verbreiteter obligat intrazellulärer Parasit, der alle kernhaltigen Zellen des Menschen und von homoiothermen Tiere infizieren kann (Wong and Remington, 1993; Dubey, 1998). *T. gondii* ist ein eukaryotischer Mikroorganismus und ist mit dem Erreger der Malaria, *Plasmodium*, verwandt. Die Toxoplasmen werden hauptsächlich in drei klonale Linien eingeteilt, die zu etwa 95% genetisch identisch sind. Allerdings unterscheiden sich diese Linien in Bezug auf ihre Virulenz deutlich. Parasiten des Typ I sind die virulentesten Stämme von *T. gondii* (Sibley and Ajioka, 2008). Die letale Dosis, bei der 100% der infizierten Labormäuse sterben (LD_{100}), ist hier ungefähr 1, wobei aber bei Typ II- und Typ III-Toxoplasmen die mittlere LD_{50} bei $\geq 10^3$ liegt (Mordue et al., 2001). Menschen in Europa und Nordamerika sind am häufigsten mit Typ II-Toxoplasmen infiziert während in Nutztieren häufig auch Typ III-Parasiten vorkommen (Howe and Sibley, 1995; Honore et al., 2000; Sibley et al., 2009).

Alle Apikomplexa besitzen mit dem Apikoplast und dem Apikalkomplex zwei typische Merkmale (Abb. 1). Der Apikoplast ist eine semiautonome Organelle mit eigenem Genom (Waller and McFadden, 2005) und wird mit der Fettsäuresynthese von *T. gondii* in Verbindung gebracht (Sato, 2011). Der sogenannte Apikalkomplex besteht neben dem Konoid aus einer Reihe von sekretorischen Organellen, die Mikronemen, Rhoptrien und Dichte Granula genannt werden (Abb. 1). Die Proteine der Mikronemen sind an der Erkennung und der Adhäsion während der Invasion des Parasiten in die Zelle beteiligt (Carruthers and Tomley, 2008) Die Adhäsionszonen befinden sich am anterioren Pol des Parasiten. *T. gondii* dringt durch einen aktiven Invasionsmechanismus in die Wirtszelle ein, wobei das Aktin-Myosin-Zytoskelettsystem des Parasiten beteiligt ist (Herm-Gotz et al., 2002). Nach Eintritt in die Wirtszelle befindet sich der Parasit in der sogenannten parasitophoren Vakuole, wobei die

Membran der PV vom Parasiten und der Wirtszelle abgeleitet ist und so modifiziert ist, dass sie vor der Fusion mit Lysosomen der Wirtszelle geschützt ist (Dubey et al., 1998) (Morisaki et al., 1995). Rhoptrien sind Organellen, die eine Reihe von Proteinen (ROPs) enthalten, wie z.B. Serin-Threonin Kinasen und Protein Phosphatasen. Sekretierte ROP Kinasen beeinflussen die Genexpression des Wirtes und sind wichtige Virulenzfaktoren des Parasiten (Bradley and Sibley, 2007). Proteine der Rhoptrien werden in die Vakuolenmembran eingebaut und vermitteln die Assoziation von Mitochondrien und endoplasmatischen Retikulum mit der parasitophoren Vakuole (Sinai et al., 1997) (Sinai and Joiner, 2001). Die Dichten Granula sind ebenfalls sekretorische Organellen. Über die Proteine der Dichten Granula ist wenig bekannt (Mercier et al., 2005). Sie sind vermutlich an der Reifung der parasitophoren Vakuole, sowie der Modifikation der PV-Membran und der intrazellulären Parasitenvermehrung beteiligt. Sie dienen damit hauptsächlich neben den Rhoptrienproteinen zur Modifikation der Wirtszelle nach der Invasion des Parasiten. Zudem spielen sie vermutlich bei der Zysten-Formation eine zentrale Rolle (Blackman and Bannister, 2001) (Mercier et al., 2005). Durch wiederholte Endodyogenie vermehrt sich der Parasit solange, bis die Wirtszelle ruptuiert und neue infektiöse Tachyzoiten freigesetzt werden (Dubey et al., 1998).

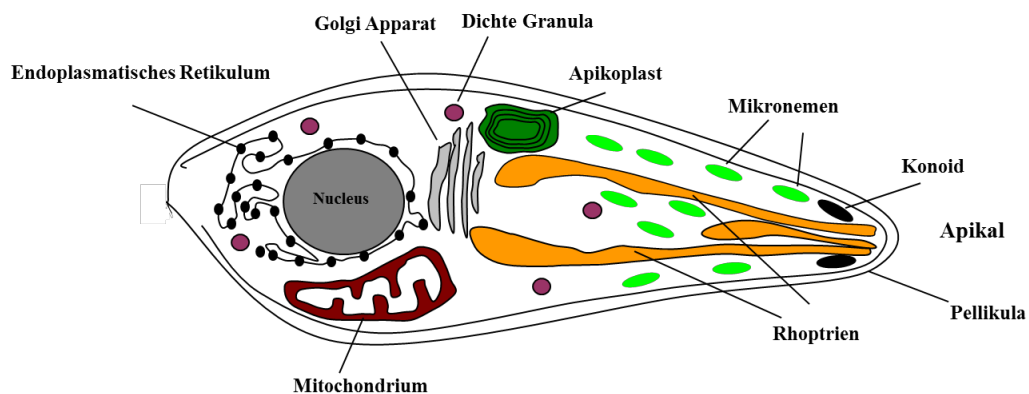


Abb. 1: Schematische Darstellung der Organellen des Parasiten *T. gondii*, verändert nach (Ajioka et al., 2001)

Der Parasit *T. gondii* ist von einer Pellikula umgeben. Am apikalen Ende befinden sich die Rhoptrien und Mikronemen. Weitere hervorzuhebende Organellen sind der Apicoplast, die Dichten Granula, das Mitochondrium und der Nucleus.

1.1.1 Der Lebenszyklus von *T. gondii*

Ein Generationswechsel zwischen ungeschlechtlicher und geschlechtlicher Fortpflanzung kennzeichnet den Lebenszyklus von *T. gondii*. Es gibt drei infektiöse Entwicklungsstadien des Parasiten: die Tachyzoiten, die Bradyzoiten und die Sporozysten. Bei der asexuellen Vermehrung spielen zwei verschiedene Stadien eine wichtige Rolle. Hierbei unterscheiden sich die Wachstumsbedingungen des Parasiten in der akuten und der chronischen Phase der Infektion. Das Tachyzoiten-Stadium stellt die schnell wachsende Form des Parasiten in der akuten Phase der Infektion dar (Gross et al., 2004). Tachyzoiten sind etwa 5 µm lang und 2 µm breit (Smith, 1995). Sie replizieren sich in der Zelle je nach Parasitenstamm mit einer Generationszeit von etwa 6 bis 14 Stunden bis sie durch Lyse die Zelle verlassen und Nachbarzellen infizieren. Bis zu 64 oder sogar 128 Parasiten häufen sich zu diesem Zeitpunkt in der Zelle an (Radke and White, 1998). Im Zuge der Immunantwort des infizierten Wirtes differenzieren die Tachyzoiten zu Bradyzoiten und bilden Gewebszysten, die zum ersten Mal 7 bis 10 Tage nach der Infektion in Erscheinung treten. Die Bradyzoiten in den Zysten vermehren sich nur langsam, haben einen reduzierten Stoffwechsel und ein verändertes Antigenprofil (Bohne et al., 1999) Diese Zysten finden sich hauptsächlich im zentralen Nervensystem und im Muskelgewebe, wo sie ein Leben lang persistieren können (Gross et al., 1996). Zysten, die durch den Verzehr von infiziertem Fleisch aufgenommen werden, rupturieren auf ihrem Weg durch den Verdauungstrakt und das bewirkt die Freilassung der Bradyzoiten. Diese infizieren das Epithelium und differenzieren zu sich schnell replizierenden Tachyzoiten und verbreiten sich somit im gesamten Körper und schließen den asexuellen Zyklus (Black and Boothroyd, 2000). Maus-virulente Stämme wachsen schneller als Maus-avirulente Stämme und einige *T. gondii*-Stämme bilden während der Vermehrung mehr Rosetten als andere (Appleford and Smith, 1997). Die geschlechtliche Vermehrung von *Toxoplasma* erfolgt ausschließlich im Dünndarmepithel der Endwirte, Hauskatzen und Katzenartigen (Felidae), nach Aufnahme der infektiösen Stadien (Dubey et al., 1998) (Abb. 2). Hier erfolgt die Schizogonie mit der Bildung von Merozoiten, und die anschließende Gamogonie mit der Bildung von Gameten. Nach Verschmelzung von Mikrogamet und Makrogamet entsteht in den infizierten Enterozyten die Zygote, welche als Oozyste nach Ruptur der Wirtszelle in das Dünndarmlumen gelangt und mit den Faeces ausgeschieden wird (Dubey et al., 1998; Dubey, 2002; 2006). Außerhalb des Wirtes sporuliert die Oozyste dann innerhalb

von wenigen Tagen, enthält die infektiösen Sporozoitien und wird oral über die Nahrung, über Wasser oder durch Aufnahme aus der Umwelt vom Zwischenwirt (Nager, Haustiere) aufgenommen (Dubey et al., 1998) (Abb. 2). Nachdem der Magen passiert ist, wird die Oozystenwand aufgelöst, die freiwerdenden Sporozoitien invadieren das intestinale Epithel und wandeln sich in die schnell replizierenden Tachyzoiten um. Diese verbreiten sich über verschiedene Wege im Wirt. Dort können sie ein breites Spektrum an verschiedenen Zelltypen infizieren und führen so zu einer systemischen Infektion (Montoya and Liesenfeld, 2004).

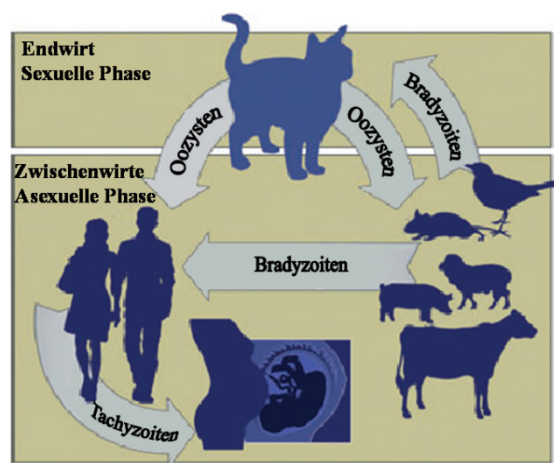


Abb. 2: Lebenszyklus von *T. gondii*, verändert nach (Sullivan and Jeffers, 2011)

Die geschlechtliche Vermehrung von *Toxoplasma* erfolgt ausschließlich im Dünndarmepithel der Endwirte, Hauskatzen und Katzenartigen (Felidae). Die Oozysten werden mit den Faeces ausgeschieden und über die Nahrung oder aus der Umwelt durch die Zwischenwirte (Nager, Haustiere und den Menschen) aufgenommen. Die freiwerdenden Sporozoitien invadieren das intestinale Epithel und wandeln sich in die schnell replizierenden Tachyzoiten um. Im Zuge der Immunantwort des infizierten Wirtes differenzieren die Tachyzoiten zu Bradyzoiten und bilden Gewebiszysten. Zysten können durch den Verzehr infizierter Nahrung aufgenommen werden und sich somit weiter verbreiten. Besondere klinische Bedeutung hat die diaplazentare Übertragung des Tachyzoiten-Parasitenstadiums von der Mutter auf das ungeborene Kind.

1.1.2 Bedeutung für den Menschen

Im gesunden Menschen stellt eine Infektion mit *Toxoplasma* in der Regel keine große Gefahr dar. Eine Infektion verläuft meist asymptomatisch oder mit leichten Grippeerscheinungen (Hill and Dubey, 2002).

Eine besondere klinische Bedeutung hat die konnatale Toxoplasmose bei Erstinfektion während der Schwangerschaft. *T. gondii* kann während der Schwangerschaft diaplazentar

von der Mutter auf den Fötus übertragen werden (Hide et al., 2009). Konnatale Infektionen im ersten Trimester der Schwangerschaft verlaufen wesentlich schwerer als nach Infektion im zweiten oder dritten Trimester (Desmonts and Couvreur, 1974). Die Übertragungsfähigkeit nimmt im Laufe der Schwangerschaft zu, während die Schädigungsrate abnimmt. Übertragungen zu Beginn der Schwangerschaft können zum Abort führen. Ein Transfer auf den Fötus zu einem späteren Zeitpunkt kann zum Teil zu Hirnbefall mit späterem Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und weiteren Organschäden führen (Gross et al., 2004). Erfolgt eine Infektion des Kindes kurz vor der Geburt, können Symptome der Gelbsucht und Organvergrößerungen auftreten. Diaplazentar infizierte Kinder können bei der Geburt unauffällig sein, Folgeschäden können allerdings noch Jahre später in Erscheinung treten. Zu ihnen gehören Hör- und Sehschäden sowie Krampfanfälle oder mentale Retardierung (Koppe et al., 1986).

Eine weitere mögliche Auswirkung einer *Toxoplasma*-Infektion ist die okuläre Toxoplasmose. Diese führt durch entstehende Läsionen der Netzhaut und Chorioidea zu Beeinträchtigungen der Sehkraft und kann bei einer Vernarbung zur Erblindung führen (Commodaro et al., 2009). Die okuläre Toxoplasmose kann sich nach einer diaplazentaren Übertragung des Parasiten im ungeborenen Kind oder während der späteren Entwicklung des Kindes entwickeln, aber auch im Erwachsenenalter nach einer postnatal erworbenen Toxoplasmose ausbilden (Montoya and Remington, 1996; Pleyer et al., 2007).

T. gondii ist ein wichtiges opportunistisches Pathogen bei immunsuprimierten Menschen, wie z.B. AIDS-Patienten oder nach einer Organtransplantation. Bei einer Schwächung der zellulären Immunabwehr kann es zu einer Reaktivierung einer latenten Infektion kommen. Hierbei wandeln sich die in Gewebezysten ruhenden Bradyzoiten in Tachyzoiten um, vermehren sich im Körper und rufen Entzündungsherde hervor. Symptome können Fieber, Kopfschmerzen, Verwirrtheit, Krämpfe und Ataxie bis hin zum Koma sein und dies kann unbehandelt nach kurzer Zeit zum Tode führen (Nissapatorn, 2009).

1.1.3 Übertragung von *T. gondii*

T. gondii kann über verschiedene Wege auf den Menschen übertragen werden. Die Infektion kann konnatal durch den diaplazentaren Transfer von Tachyzoiten auf den Fötus bei einer Erstinfektion oder selten durch Reaktivierung von Gewebezysten während einer Schwangerschaft erfolgen (Hide et al., 2009). Eine Übertragung kann aber auch auf oralem

Weg erfolgen, beispielsweise durch den Verzehr von unzureichend gegartem, zystenhaltigem Fleisch oder durch die Aufnahme von sporulierten Oozysten durch mit Katzenkot kontaminiertes Trinkwasser oder Nahrungsmittel (Montoya and Remington, 2008; Jones and Dubey, 2010). Das Ernährungsverhalten der verschiedenen menschlichen Bevölkerungen beeinflusst den jeweiligen Durchseuchungsgrad (Pappas et al., 2009). Weitere Infektionsquellen sind Tachyzoitenhaltige Bluttransfusionen oder Transplantate mit Gewebezysten (Ryning et al., 1979).

Die Infektion mit *T. gondii* beim Menschen ist weltweit verbreitet, obwohl die Prävalenz sehr variiert. In Amerika und in England sind etwa 16-40% der Bevölkerung infiziert wobei es in Zentral-und Süd-Amerika sowie in Europa zwischen 50 und 80% schwankt (Hill and Dubey, 2002). In Deutschland liegen keine validen, aktuellen epidemiologischen Daten zur Toxoplasmose vor. Es wird von einer Seroprävalenz von 26-54% bei schwangeren Frauen ausgegangen, wobei die Durchseuchungsrate mit dem Lebensalter korreliert und um etwa 1% pro Lebensjahr zunimmt (Gross, 2004). Als Risikofaktoren für eine *Toxoplasma* Infektion gelten Erdarbeiten, Ernährungsgewohnheiten, Migration und Armut (Jones et al., 2001; Kruszon-Moran and McQuillan, 2005).

1.2 Parasit-Wirt-Interaktion

1.2.1 Immunabwehr

Nach einer *Toxoplasma*-Infektion kommt es zur effektiven Aktivierung des Immunsystems. Die Kontrolle der Ausbreitung von *T. gondii* wird hauptsächlich durch die Aktivierung der zellulären Immunantwort bestimmt (Denkers and Gazzinelli, 1998). Dabei werden die stoffwechselaktiven und stark immunogenen Tachyzoiten aus dem Wirtsgewebe eliminiert. Im Zuge der sich entwickelnden Immunantwort erfolgt die Differenzierung zu sich langsam teilenden Bradyzoiten, die in Gewebezysten persistieren. Aufgrund der geringen Immunogenität, der intrazellulären Lokalisation, der fehlenden Wirtszellruptur u.a. durch Ausbildung einer rigiden Zystenwand und der Zystenbildung in Organen mit verringerter Immunreaktivität bleiben die Bradyzoiten vom Immunsystem weitgehend unerkant. Sofort nach Infektion kommt es zu einer unspezifischen Aktivierung von Makrophagen und natürlichen Killerzellen (Hauser et al., 1983). *T. gondii*

löst aber auch CD4⁺-und CD8⁺-T-Zellantworten aus, die von cytoplasmatischen und endozytotischen Transport von Antigenen für die MHC-Klasse I-und II-Präsentation abhängen (Gazzinelli et al., 1991). Einige Hinweise zeigen, dass in der akuten Phase der Infektion vor allem IFN- γ -Produktion und Zytotoxizität durch CD8⁺ Lymphozyten zur Parasitenkontrolle beitragen, wohingegen in der chronischen Phase eher die Wirkung der CD4⁺ Zellen von Bedeutung ist (Gazzinelli et al., 1991). Wie es zur Präsentation von Antigenen mittels MHC-Klasse I-Molekülen kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit ist die Prozessierung von Parasitenproteinen für die MHC-Klasse I-abhängige Präsentation nachdem Antigene durch den Parasiten aus der parasitophoren Vakuole in das Wirtszellcytosol sekretiert wurden (Gubbels et al., 2005). Ein Protein der Dichten Granula, das sogenannte GRA4, welches vom Tachyzoiten Stadium aus der parasitophoren Vakuole sekretiert wird, gilt als ein solcher CD8-T-Zell-Aktivator (Frickel et al., 2008). Eine Infektion mit *T. gondii* bewirkt die Induktion von Interleukin-12 in dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten. Die Freisetzung von IL-12 aktiviert die Produktion von IFN- γ durch Natürliche Killerzellen sowie die Differenzierung von TH1-Typ CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. CD8⁺-Zellen können infizierte Zellen lysieren und spielen eine wichtige Rolle bei der Produktion von INF- γ , welches eine wichtige Rolle in der protektiven Immunität gegen den Erreger spielt (Suzuki et al., 1988; Suzuki et al., 2011). INF- γ sorgt unter anderem für die Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen sowie die Induktion von MHC Klasse II Molekülen. Durch eine Stimulierung von Makrophagen wird die intrazelluläre Vermehrung des Parasiten durch den Abbau von Tryptophan, durch die schädigende Wirkung von reaktiven Sauerstoff-und Stickstoffradikalen sowie durch Lyse der PVM mittels p47 und p65 GTPasen gehemmt bzw. der Parasit abgetötet (Martens et al., 2005) Die Aktivierung der verschiedenen zellulären Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunantwort eliminiert die Mehrzahl der Tachyzoiten in der akuten Phase und kontrolliert außerdem die chronische Phase (Suzuki et al., 1988; Lang et al., 2007). Die Immunantwort reicht allerdings nicht aus, um *T. gondii* vollständig zu beseitigen, daher differenzieren Tachyzoiten zu den schwach-immunogenen, ruhenden Bradyzoiten, die sich im Gewebe enzystieren (Gross and Bohne, 1994).

1.2.2 Immunevasionsmechanismen

T. gondii besitzt die Fähigkeit, lang anhaltende, symptomlos verlaufende Infektionen im Menschen hervorzurufen und in seinem Wirt dauerhaft zu persistieren. Der Parasit hat damit die Fähigkeit entwickelt, dem Immunsystem erfolgreich zu entgehen. Es sind diverse Mechanismen des Parasiten bekannt, die zu dieser Immunevasion beitragen. *T. gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit und durch diese Art der Vermehrung entgeht er weitgehend den humoralen Abwehrmechanismen. Zudem wird durch die Differenzierung von den schnell replizierenden Tachyzoiten der akuten Phase der Infektion zu den stoffwechsellinaktiven Bradyzoiten in der chronischen Phase eine Entzündungsreaktion vermieden (Dubey et al., 1998; Weiss and Kim, 2000). Durch die Stadienkonversion kommt es zu einer grundlegenden Änderung des Antigenprofils, was zur Persistenz des Parasiten beiträgt (Lyons et al., 2002). Desweiteren werden bei der aktiven Invasion des Parasiten Membranproteine der Wirtszelle von der Membran der parasitophoren Vakuole ausgeschlossen, sodass die PV nicht mit Lysosomen der Wirtszelle fusioniert (Mordue and Sibley, 1997; Charron and Sibley, 2004). Zusätzlich können z. B. STAT1-abhängige Promotoren durch *T. gondii* blockiert werden. Dies führt in verschiedenen Zellen u. a. zu der Blockierung der IFN- γ -induzierten Expression von MHC Klasse II-Molekülen (Lüder et al., 2003; Lang et al., 2006; Lang et al., 2012), die normalerweise Proteinfragmente vakuolärer Pathogene auf der Oberfläche präsentieren. Dadurch ist die Aktivierung der CD4⁺ Zellen vermindert (Lüder et al., 2001).

Ein wichtiger Effektormechanismus des Immunsystems ist die Apoptose. Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und verhindert unter anderem die Vermehrung intrazellulärer Pathogene. Die Hemmung der Wirtzellapoptose ist daher für die intrazelluläre Entwicklung von *T. gondii* von zentraler Bedeutung (Lüder and Gross, 2005).

1.3 Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes und ein physiologischer Schutzmechanismus des mehrzelligen Organismus vor überzähligen, schadhaften und

infizierten Zellen. Der Begriff Apoptose wurde erstmals in einer Veröffentlichung von Kerr, Wyllie und Currie im Jahre 1972 aufgegriffen und beschreibt den morphologischen Prozess, welcher zur kontrollierten zellulären Selbstzerstörung führt (Kerr et al., 1972). Der apoptotische Zelltod ist ein aktiver und genau regulierter Prozess, welcher eine lebenswichtige Rolle in der Entwicklung von mehrzelligen Organismen und in der Regulation und Erhaltung der Zellpopulationen in Gewebe unter physiologischen und pathologischen Bedingungen spielt. Während der Entwicklung mehrzelliger Organismen werden viele überzählige Zellen produziert, welche den programmierten Zelltod durchlaufen und dadurch u. a. zur Ausformung und Differenzierung von Geweben und Organe beitragen (Delhalle et al., 2003). Die Apoptose spielt bereits in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. Die Hände eines menschlichen Embryos sind zunächst nur als unstrukturierte Handplatte angelegt und erst durch das Auftreten sogenannter Apoptosezonen kommt es zur Trennung der einzelnen Fingerstrahlen (Zuzarte-Luis and Hurle, 2005). Ein anderes Beispiel für das Auftreten von Apoptose ist die Entwicklung des Gehirns. Hier stirbt die Hälfte der Neuronen, die während der Entwicklung ursprünglich angelegt wurden, in späteren Phasen bei der Formierung des differenzierten Gehirns (Hutchins and Barger, 1998). Auch Zellen eines ausgewachsenen Organismus durchlaufen regelmäßig den programmierten Zelltod. Zur Erhaltung einer konstanten Zellzahl müssen Proliferation und Apoptose in Balance stehen (Rathmell and Thompson, 2002).

Im Immunsystem dient die Apoptose zum Schutz des Organismus vor infizierten und autoreaktiven Zellen und trägt zur Kontrolle der Immunreaktion bei. Die Mehrzahl der sich entwickelnden Lymphozyten sterben während der genetischen Reorganisation bei der Entwicklung der Antigen-Rezeptoren (Rathmell and Thompson, 2002). Bei der sogenannten negativen Selektion werden diese apoptotisch, wenn sie eine hohe Affinität gegenüber eigenen Antigenen zeigen. Die Eliminierung von potentiell autoreaktiven Zellen zeigt sich auch bei den B-Lymphozyten, den Hauptakteuren der adaptiven humoralen Immunantwort (Grimaldi et al., 2005). Die Apoptose ist auch ein Schutzmechanismus vor infizierten Zellen. Durch die Eliminierung infizierter Wirtszellen wird eine weitere Vermehrung von intrazellulären Pathogenen und deren Ausbreitung verhindert (Hasnain et al., 2003). Dies konnte u. a. für Bakterien gezeigt werden (Grassme et al., 2001) und gilt auch für intrazelluläre Parasiten wie *T. gondii* (Lüder and Gross, 2005). Zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen können Granzyme sezernieren, die in der Zielzelle den Zelltod auslösen und verfügen außerdem über membrangebundene Fas-

Liganden (CD95L) die in der infizierten oder transformierten Zellen ein Apoptose-Signal auslösen (Trapani, 1998). Infizierte Zellen werden somit eliminiert und auf diese Weise kann eine Vermehrung der Parasiten in den Zellen verhindert werden.

1.3.1 Morphologische Veränderung der Zelle während der Apoptose

Im Licht- und Elektronenmikroskop ist eine apoptotische Zelle an den stereotypischen morphologischen Veränderungen während des Apoptoseprozesses zu erkennen. Die Zelle schrumpft, rundet sich ab und löst sich aus dem Zellverband. Das Chromatin kondensiert und lagert sich an der Kernmembran ab (Jimenez-Ruiz et al., 2010). Die Plasmamembran bildet kleine Aussackungen und Blasen und diese schnüren sich als kompakte membranumgebende Strukturen, den sogenannten „Apoptose-Körperchen“ ab, die dicht gepackt mit Zytosol, Chromatin und Organellen sind. Diese Körperchen lösen keine Entzündungsreaktion aus, da kein Zytoplasma in den Extrazellularraum austritt, sondern werden von Makrophagen und Nachbarzellen phagozytiert und eliminiert (Kerr et al., 1972; Messam and Pittman, 1998; Saraste and Pulkki, 2000; Jimenez-Ruiz et al., 2010)

1.3.2 Molekularbiologie der Apoptose

Von zentraler Bedeutung im Signalnetzwerk der Apoptose sind Cystein-Proteasen, die sogenannten Caspasen (cysteine-dependent aspartate-specific proteases), die Proteine spezifisch hinter Aspartatresten spalten (Talanian et al., 1997; Denault and Salvesen, 2002; Richardson and Kumar, 2002). In der Zelle werden die Caspasen als inaktive Zymogene (Procaspasen) synthetisiert und nach Induktion spezifischer Signalkaskaden durch Spaltung aktiviert (Fan et al., 2005). Die Aktivierung dieser Signalkaskaden erfolgt entweder über die Bindung von Liganden an membranständige Todesrezeptoren wie Fas und TNF-Rezeptor (extrinsischer Weg) oder über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (intrinsischer Weg) (Denault and Salvesen, 2002). Beide Wege münden in der Aktivierung sogenannter Effektorcaspasen wie z.B. Caspase 3, deren Aktivierung einen hochspezifischen Marker für apoptotische Zellen darstellt (Amarante-Mendes and Green, 1999). Bis heute sind beim Menschen 10 Hauptcaspasen identifiziert worden.

Hierzu gehören die Initiatorcaspasen Caspase 2, 8, 9 und-10, die Effektorcaspasen Caspase 3, 6, und-7, und die Entzündungscaspasen Caspase 1, 4, und-5 (Cohen, 1997; Earnshaw et al., 1999). Aktive Effektorcaspasen spalten Proteine des Zytoskeletts und der Kernmembran und führen so zu den morphologisch sichtbaren Veränderungen der Zelle (Thornberry and Lazebnik, 1998; Earnshaw, 1999; Hacker, 2000). Aktive Caspase-3 aktiviert unter anderem auch den sogenannten DNA Fragmentation Factor (DFF), was zur Fragmentierung der DNA in der apoptotischen Zelle führt (Liu et al., 1997).

Während der Apoptose liegen DNA-Fragmente von 180-200 Basenpaaren vor, die durch Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen entstehen. In der Agarosegelelektrophorese kann durch Auftrennung dieser Fragmente somit eine charakteristische DNA-Leiter dargestellt werden, die zum Nachweis von apoptotischen Zellen dient (Bortner et al., 1995). Ein anderes Merkmal der Apoptose ist die Externalisierung von Phosphatidylserin in der Plasmamembran, welche in einer schnellen Erkennung und Phagocytose der apoptotischen Zellen durch Makrophagen resultiert. Bereits in der frühen Phase der Apoptose wird dabei Phosphatidylserin in der Zellmembran oxidiert und von der inneren Phospholipidschicht in die äußere transloziert (Bratton et al., 1997; Kagan et al., 2003). Annexin V ist ein rekombinantes Phosphatidylserin-bindendes Protein welches spezifisch mit Phosphatidylserin interagiert und zur Detektion von Apoptose verwendet wird (van Engeland et al., 1997).

Es sind zwei Hauptwege der Apoptose beschrieben, der extrinsische oder Todesrezeptor-vermittelte Signalweg und der intrinsische oder mitochondriale Signalweg. Es wurde gezeigt, dass die zwei Signalwege häufig miteinander gekoppelt sind und Moleküle des Einen auch den Anderen beeinflussen können.

1.3.3 Der extrinsische Signalweg der Apoptose

Der extrinsische Weg der Apoptose wird durch die Aktivierung von sogenannten Todesrezeptoren vermittelt. Diese sind Transmembranrezeptoren, die nach der Ligation mit spezifischen Liganden apoptotische Signale weiterleiten. Todesrezeptoren gehören zur Familie der Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren (TNFR) wie z. B. TNFR-1 und Fas/CD95 (Ashkenazi, 2002). Mitglieder dieser Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren Familie teilen ähnliche Cystein-reiche extrazelluläre Domänen und haben cytoplasmatische Domänen mit

über 80 Aminosäuren, "die Todes-Domänen" genannt werden (Ashkenazi and Dixit, 1998). Die cysteinreichen extrazellulären Domänen bedingen die Erkennung der spezifischen Liganden, führen zur Trimerisierung und damit zur Aktivierung der Todesrezeptoren (Naismith and Sprang, 1998). Die nachfolgenden Signale werden durch die "death domains" (DD) vermittelt. Adaptor Moleküle, wie z. B. FADD oder TRADD werden durch eigene DD an die aktiven Rezeptoren rekrutiert und dabei der "death inducing signalling complex" (DISC) gebildet. Zusätzlich besitzt das Adaptormolekül FADD eine "death effector domain" (DED), durch die Procaspase 8 an den DISC mittels DED-DED Bindung rekrutiert wird. Dies führt zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase 8. Die aktive Caspase kann nun nachgeschaltete Effektorcaspasen aktivieren, was zur Apoptose der Zelle führt (Scaffidi et al., 1999).

1.3.4 Der intrinsische Signalweg der Apoptose

Im Zentrum des intrinsischen Apoptosesignalweges stehen die Mitochondrien. Dieser Signalweg wird durch zellulären Stress, wie z. B. ionisierende Strahlung, DNA-Schäden, oxidativen Stress, Mangel an Wachstumsfaktoren oder intrazelluläre Infektionen ausgelöst. Dies führt zu Veränderungen der inneren Mitochondrienmembran und zum Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials. Die Erhöhung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran resultiert in der Freisetzung von proapoptotischen Proteinen und Cytochrom c in das Zytoplasma der Zelle (Green and Reed, 1998; Lindholm and Arumae, 2004; Spierings et al., 2005). Signalgeber sind hierfür Mitglieder der Bcl-2-Familie. "BH3-only" Mitglieder dieser Protein-Familie aktivieren direkt oder indirekt die proapoptotischen Proteine BAX und BAK. Diese Proteine oligomerisieren in der äußeren Mitochondrienmembran und es entstehen dadurch Poren in der Membran, durch die proapoptotische Proteine und Cytochrom c in die Zelle gelangen können (Antonsson, 2001; Brunelle and Letai, 2009). Cytochrom c bindet im Cytosol der Zelle an APAF-1 ("apoptosis protease-activating factor-1") (Abb. 3). Dieses Protein besitzt eine "caspase recruitment domain" (CARD), eine Nukleotid-bindende Domäne (NOD) und repetitive Tryptophan-Aspartat-Sequenzen (WD40 Region) am C-terminalen Ende (Riedl et al., 2005). Nach der Bindung von Cytochrom c an die WD40-Region durchläuft APAF-1 eine Konformationsänderung und dies führt zur Oligomerisierung von sieben Apaf-1/Cytochrom c-Heterodimeren in Gegenwart von dATP zum zirkulären radähnlichen

„Apoptosom“ (Riedl and Salvesen, 2007). Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass bei dieser Oligomerisierung keine Energie aus der Hydrolyse von dATP benötigt wird, sondern lediglich die Bindung von Cytochrom c und dATP an APAF-1 die Bildung des Apoptosoms fördert (Reubold et al., 2009).

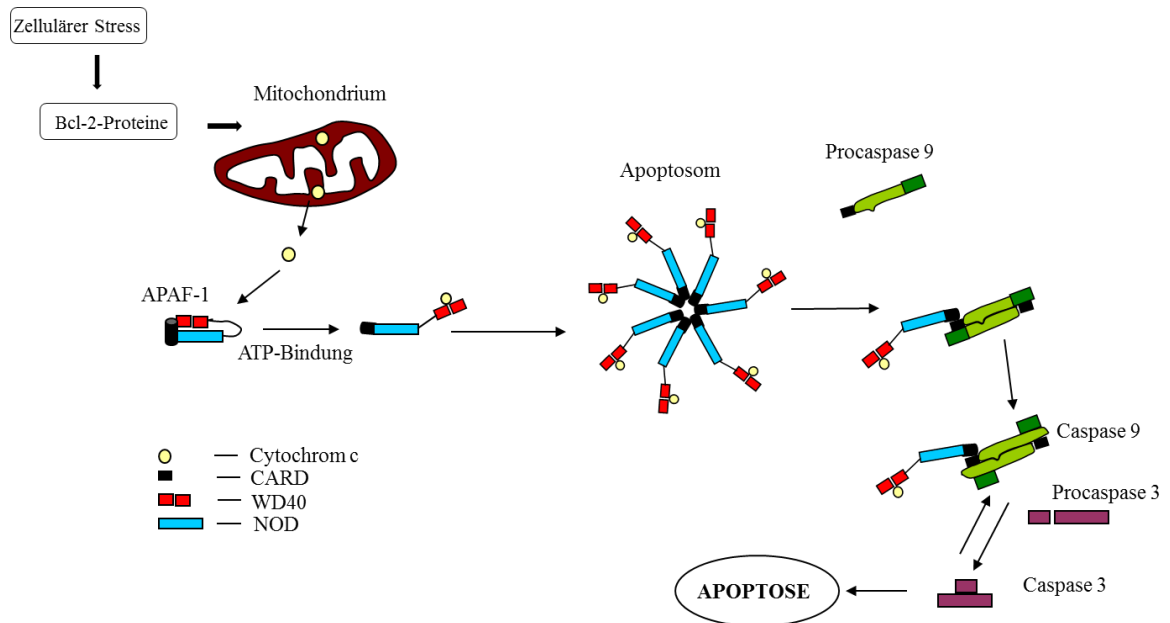


Abb. 3: Schematische Darstellung des intrinsischen Signalweges der Apoptose, verändert nach (Riedl and Salvesen, 2007)

Durch Stresssignale kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Dieses bindet an APAF-1 und bewirkt unter ATP-Bindung die Oligomerisierung von sieben APAF-1/Cytochrom c Heterodimeren zum Apoptosom. Dieser Komplex rekrutiert Procaspase 9 und die aktive Caspase 9 spaltet die Effektorcaspase 3, die zentrale Struktur- und Regulationsproteine spaltet und damit zur Apoptose führt.

Die Nabe des Apoptosoms bilden die CARD-Domänen von APAF-1 und jede CARD dient als Plattform zur Dimerisierung zweier Procaspase-9-Moleküle (Boatright and Salvesen, 2003; Riedl and Salvesen, 2007). Durch eine CARD-CARD Interaktion wird die inaktive Procaspase 9 an das Apoptosom rekrutiert. Die Prodomäne von Caspase 9 wird während der Apoptose nicht entfernt, Caspase 9 muss an das Apoptosom gebunden bleiben, um die katalytische Aktivität aufrechtzuerhalten (Bratton et al., 2001). Es wird vermutet, dass die WD40-Region neben ihrer inhibitorischen Funktion bei der Apoptosombildung auch eine Rekrutierungsdomäne für Caspase 3 und 7 ist (Cain et al., 1999). Während der Apoptose spaltet Caspase 3 die CARD-Region von APAF-1 ab. Dies führt zur Freisetzung von Caspase 9, welche ohne den allosterischen Aktivator APAF-1 die Caspase-Aktivität verliert. Caspase 3 löst die WD40-Region und die freie aktive Caspase degradiert Proteine der Zellregulierung und führt somit zur Apoptose (Lauber et al., 2001). Die aktive Caspase

9 spaltet und aktiviert die Effektorcaspasen 3 und 7, was zur Apoptose führt (Bratton et al., 2001; Graumann et al., 2009).

1.3.5 Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *T. gondii*

Die Apoptose ist ein wichtiger Abwehrmechanismus von Organismen gegen intrazelluläre Pathogene und zur Regulation der Immunabwehr während einer Infektion (Graumann et al., 2009). Der obligat intrazelluläre Parasit *T. gondii* ist bei seiner Entwicklung auf die intakte Wirtszelle angewiesen und hat dazu Mechanismen entwickelt, um die Wirtszellapoptose erfolgreich zu hemmen (Luder and Gross, 2005). Eine Inhibierung der Wirtszellapoptose wurde für viele Parasiten, Bakterien und Viren beschrieben (Benedict et al., 2002; Hacker and Fischer, 2002; Schaumburg et al., 2006). In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *T. gondii*-infizierte Zellen nach Behandlung mit Apoptose-induzierenden Stimuli wie z. B. Actinomycin D, Mangel an Wachstumsfaktoren, TNF oder nach UV-Bestrahlung, die sowohl den intrinsischen, als auch den extrinsischen Signalweg der Apoptose auslösen können, resistent sind (Goebel et al., 1998; Nash et al., 1998; Goebel et al., 2001; Payne et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* die Aktivierung der Caspase-Kaskade in der Wirtszelle manipuliert (Goebel et al., 2001; Payne et al., 2003; Sinai et al., 2004). Inzwischen sind verschiedene Mechanismen der Hemmung der Apoptose durch *T. gondii* untersucht und beschrieben worden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass *T. gondii* die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien erfolgreich hemmt (Goebel et al., 2001). Dies führt in infizierten Zellen zur Hemmung der Caspase 3-Aktivierung, wie auch zur Hemmung der oberhalb befindlichen Caspasen 8 und 9 (Goebel et al., 2001; Payne et al., 2003). Die verminderte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien dürfte u.a. durch erhöhte Level an anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie, wie z. B. Mcl und A1, (Goebel et al., 2001; Orlofsky et al., 2002; Molestina et al., 2003) und eine Blockade der proapoptotischen Proteine Bax und Bak (Hippe et al., 2009) reguliert sein. Caspase 8 ist die Hauptinitiatorcaspase des extrinsischen Signalweges der Apoptose und wird nach der Ligation der Todes-Rezeptoren mit den Liganden Fas/CD95, TNFR1 und TRAIL aktiviert (Naismith and Sprang, 1998). In *T. gondii*-infizierten Zellen konnte eine Degradierung der Caspase 8 und infolge dessen eine Blockierung der Fas/CD95 vermittelten Apoptose durch den Parasiten nachgewiesen werden (Vutova et al., 2007). Diese bisher beschriebenen

Mechanismen der Hemmung der Wirtszellapoptose durch den Parasiten sind vielfältig und betreffen innerhalb des intrinsischen Apoptosesignalweges Faktoren und Prozesse oberhalb der Mitochondrien oder den extrinsischen Signalweg. Für die Apoptose-Signalkaskade unterhalb der Mitochondrien konnte eine dosisabhängige Inhibierung der Cytochrom c-induzierten Aktivität der Caspase 3/7 durch den Parasiten im zellfreien System gezeigt werden, was auf eine direkte Interaktion des lebenden Parasiten mit den Komponenten der Caspase-Kaskade hindeutete (Keller et al., 2006). Caspase 3 kann auch direkt durch Granzym B aktiviert werden. Es wurde gezeigt, dass *T. gondii* diese Aktivierung nicht inhibieren kann und macht somit deutlich, dass durch den Parasiten keine generelle Hemmung der aktiven Caspase 3 stattfindet, sondern eine spezifische Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität vorliegt. Auch konnte in den Untersuchungen gezeigt werden, dass Kulturüberstände von kultivierten, extrazellulären Parasiten die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität dosisabhängig hemmt. Dies deutet darauf hin, dass an der Hemmung exkretorisch-sekretorische (ES) Moleküle aus den Mikronemen, Rhoptrien oder Dichten Granula von *T. gondii* beteiligt sind. Diese Moleküle beeinflussen unmittelbar die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase-Kaskade unabhängig einer veränderten Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien oder einer Hochregulation von anti-apoptotischen Molekülen durch die Wirtszelle (Keller et al., 2006). Ausgehend hiervon wurde dieses zellfreie System in früheren Arbeiten genutzt, um parasitäre anti-apoptotische Moleküle des Parasiten zu identifizieren. Im zellfreien System haben exogen zugegebene Moleküle des Parasiten hierbei direkten Kontakt zu den cytosolischen Komponenten der Signalkaskade der Wirtszelle. Es zeigte sich, dass nicht nur Tachyzoiten, sondern auch komplexes Parasitenlysate die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase-Kaskade dosisabhängig hemmt. Mit Hilfe von HPLC-Fraktionierung und MALDI-tof Massenspektrometrie konnten Parasiten-Proteine identifiziert werden, die vielversprechende Kandidaten für den Apoptose-inhibierenden Effekt von *T. gondii* darstellten. Bei diesen Proteinen handelte es sich vor allem um die NTPase und HSP70 von *T. gondii* (Schaumburg, 2007)

Ziele der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten konnte also deutlich gezeigt werden, dass der intrazelluläre Parasit *T. gondii* die Wirtszelle effektiv vor mitochondrial vermittelter Apoptose schützt. Es konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* die durch Cytochrom c-induzierte Aktivierung von Caspase 9 und 3 in einem zellfreien System effektiv hemmt. Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Grundlagen dieser Hemmung zu untersuchen und parasitäre Effektormoleküle des Parasiten zu identifizieren. Ausgehend von oben genannten Erkenntnissen ergaben sich folgende wichtige Fragestellungen für diese Arbeit.

1. Wie verhindert *T. gondii* die Aktivierung der Caspase 3 in cytosolischen Zellextrakten nach Zugabe von Cytochrom c und dATP? Da gezeigt werden konnte, dass auch die Spaltung der Initiatorcaspase 9 durch den Parasiten gehemmt ist, sollen dabei vor allem die Apoptosombildung und deren Regulatoren in Gegenwart von *T. gondii* charakterisiert werden.
2. Welche parasitären Effektormoleküle sind für die Inhibierung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung verantwortlich?
3. Findet *in vivo* in *Toxoplasma*-infizierten Zellen auch eine Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung wie *in vitro* statt?

Eine Aufklärung der molekularen Mechanismen der Hemmung durch den Parasiten könnte zur Entwicklung neuer Strategien bei der Behandlung der Toxoplasmose beitragen und helfen neue Therapien zu entwickeln, die die ungehinderte intrazelluläre Entwicklung des Parasiten verhindern würde.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien

	Beschreibung	Hersteller
Cryoröhrchen	Nunc, 2 ml	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Filterpapier	Whatman Grade 4	Rettberg, Göttingen
Glasplättchen	Ø 13 mm	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Objektträger	76 x 26 mm, Mattrand	Knittel Gläser, Braunschweig
Nitrozellulosemembranen	Hybond ECL	GE Healthcare, München
Petrischalen	Ø 94 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsröhrchen	1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	15 und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Skalpelle	Technocut	HMD Healthcare, Hereford
Spatel	Zellschaber 24 cm	Biochrom, Berlin
Zellkulturflaschen	T75 (75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten	12- und 6-Lochplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Erlenmeyerkolben mit Schikane	2 Liter Volumen	Roth, Karlsruhe
Erlenmeyerkolben	100, 250 ml Volumen	Roth, Karlsruhe
Einmalküvetten		Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Cuvette 0,2 cm	BioRAD, München
Chromatographie Säulen	Poly-Prep Chromatography colums	BioRAD, München
Vivaspin 2	10000 MWCO PES	Satorius stedim Biotech, Göttingen
Membranfilter	3,00 µm, isopore	Millipore Bedford, USA
PD-10 Desalting Columns	Sephadex G-25	GE Healthcare, München

2.1.2 Lösungen und Chemikalien

2.1.2.1 Basiskulturmedien

DMEM:	Pulvermedium ohne Na-Pyruvat 2 mM HEPES 1,6 mM NaHCO ₃ pH 7,2	Biochrom, Berlin
RPMI:	RPMI 1640 Pulvermedium 2 g/L NaHCO ₃ pH 7,2	Biochrom, Berlin

2.1.2.2 Spezielle Kulturmedien

Für L929-Zellen

DMEM
3% Hyclone FCS,
1% NEAA,
1 mM Na-Pyruvat
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin

Für HFF-Zellen

DMEM
10% Hyclone FCS,
1% NEAA
1 mM Na-Pyruvat
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin

Für *Toxoplasma*

RPMI
1% Hyclone FCS
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin

Für Jurkat-Zellen

RPMI
10% Hyclone FCS
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin

Für HeLa-Zellen

RPMI
10% Hyclone FCS
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin

Einfriermedium

40% FCS
40% Medium
20% DMSO

Lurio Broth (LB)-Medium

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

LB-Platten

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

100 µg/ml Ampicillin und gegebenenfalls
34 µg/ml Chloramphenicol

2.1.2.3 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Tab. 2: Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Ac-DEVD-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Ac-LEHD-AMC	Bachem, Weil am Rhein
Acryl-Bisacrylamid (30% ig)	Roth, Karlsruhe
Aminocaprinsäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxosulfat	Merck, Mannheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
App(NH)p	Sigma-Aldrich, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Amresco, Solon
BSA	Biomol, Hamburg
Caspase-3-Inhibitor IV	Calbiochem, Darmstadt
Ac-AMQD-CHO	
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
Coomassie Brilliantblau R 250	Merck, Mannheim
Cytochrom c (50 mg aus Rinderherz)	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Sigma-Aldrich, München
DTT	Sigma-Aldrich, München
ECL-Detektionsreagenz	GE Healthcare, München
EDTA	Merck, Mannheim
EDTA-Lösung (1% (w/v) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Biochrom, Berlin
Essigsäure	Roth, Karlsruhe

Ethanol	Merck, Mannheim
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Sigma-Aldrich, München
Immersionsöl 518N	Zeiss, Göttingen
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	Socufin
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Merck, Mannheim
Na-Cacodylat	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Mannheim
NaF	Merck, Mannheim
NaH ₂ PO ₄	Merck, Mannheim
Na-Orthovanadate	Sigma-Aldrich, München
Na-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich, München
Natriumazid	Merck, Mannheim
Ni-NTA-Agarose	Novagen
Paraformaldehyd	Merck, Mannheim
PBS (Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Biochrom, Berlin
Pepstatin	Sigma-Aldrich, München
PMSF	Sigma-Aldrich, München
PonceauS (14%)	Roth, Karlsruhe
Propansulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich, München
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München

Proteasen-Inhibitor-Cocktail “complete” Mini, EDTA free	Roche, Prenzberg
Quick Ligase	New England Biolabs
RNasin (40U/ μ l)	Promega, Madison
rProtein-A-Sepharose, Fast Flow	Amersham Biocience, Freiburg
Salzsäure (37%)	Merck, Mannheim
Saponin	Sigma-Aldrich, München
SDS	Serva, Amstetten
Shield 1	Clontech, Mountain View, USA
Strep-Tactin Sepharose	IBA, Göttingen
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Mannheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin (0,25% in PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+})	Biochrom, Berlin
Tween-20	Sigma-Aldrich, München
Urea	Calbiochem, Darmstadt

Tab. 3: Stammlösungen

Bezeichnung	Konzentration
Ampicillin	100 mg/ml
App(NH)p	100 mM
BSA	10 mg/ml
Caspase-3-Inhibitor-IV	5 mM
CHAPS	0,1 g/ml in MDB-Puffer
Chloramphenicol	34 mg/ml

Cytochrom c	10 mg/ml
dATP	200 mM
DEVD-AMC und LEHD-AMC	10 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 M
Proteasen-Inhibitor-Cocktail (PIC)	1 Tablette/ 400 µl H ₂ O

Tab. 4: Molekulargewichtsmarker

Bezeichnung	Hersteller
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs
GeneRuler 1kb DNA-Ladder	Fermentas, St.Leon-Roth

2.1.3 Vektoren und Konstrukte

Tab. 5: Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pQE30 N-terminal 6x His-tag, Ampicillin-Resistenz	Qiagen, Hilden
pASK-IBA3plus C-terminal Strep-tag, Ampicillin-Resistenz	IBA, Göttingen
pPTuner N-terminal DD-tag	Clontech, Mountain View, USA

2.1.4 Geräte

Tab. 6: Geräte

Beschreibung	Typ	Hersteller
Binokulares Mikroskop	DMIL	Leica Mikrosystems, Wetzlar
Brutschrank	BB 6220 CU	Heraeus, Hanau
Geldokumentationsanlage	ImageQuant LAS-4000	Fujifilm, Düsseldorf
Konfokales Laserscanmikroskop	TCS SPII	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroplattenleser	Victor ³ V	PerkinElmer, Rodgau
Mikroskop	Axiostar Plus	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Plattenphotometer	LP 400	Sanofi, Frankfurt a. M.
Powersupply	Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia Biotech, Wien
SDS-PAGE System	Protean	BioRad, München
Semidry-Blotgerät	Semidry-Electroblotter	Sartorius, Göttingen
Sterilwerkbank		BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Thermocycler	LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Zählkammer	Neubauer	Roth, Karlsruhe
Zentrifugen	Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau
	Avanti TM J-25	BeckmannCoulter, Krefeld
pH-Meter	Modell 766	Calimatic, Knick, Berlin
Überkopf-Rotator	Mixing Rotor Variospeed Variotins	Renner, Berlin
Ultraschall-Homogenisator	Sonifier 250	Branson, USA

2.1.5 Kits

Tab. 7: Kits

Anwendung	Name	Hersteller
Reverse Transkription	Omniscript [®] RT Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Isolation	GenElute [™] Mammalian Total RNA Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, München
Plasmid-Isolation	GenElute [™] Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, München
PCR Reinigung	Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.6 Lebendes Material

Tab. 8: Zelllinien, Parasiten und Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
L929 Zellen	Murine Fibroblasten	institutseigene Charge
HFF-Zellen	Humane Vorhaut-Fibroblasten	institutseigene Charge
HeLa-Zellen	Humane Zervikalkarzenomzellen	ECACC No: 88022401
Jurkat-Zellen	Humane T-Lymphomzellen	ECACC No: 88042803
Jurkat (JMR)-Zellen	Humane T-Lymphomzellen	Ingo Schmitz, Düsseldorf
Jurkat (F9)-Zellen	Humane T-Lymphomzellen	Ingo Schmitz, Düsseldorf
p-CC-NTE Toxoplasmen	Maus-avirulenter Stamm Typ II	institutseigene Charge, klinisches Isolat (Groß, 1991)
RH Toxoplasmen	Maus-virulenter Stamm Typ I	Sabin, U.S.A., 1941
BK Toxoplasmen	Maus-virulenter Stamm Typ I	Winser, Holland, 1948
ME49 Toxoplasmen	Maus-avirulenter Stamm Typ II	institutseigene Charge

C56 Toxoplasmen	Maus-virulenter Stamm Typ III	institutseigene Charge
CEP Toxoplasmen	Maus-virulenter Stamm Typ III	institutseigene Charge
<i>Escherichia coli</i>	Stamm DH5 α und Stamm BL21 DE3	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7 Antikörper

Die Sekundärantikörper und Konjugate wurden von Dianova, Hamburg bezogen.

Tab. 9: Antikörper für Western Blot Färbung

Primäre		Sekundäre
Antikörper/Bezeichnung (Verdünnung)	Herkunft	Antikörper/Bezeichnung (1:2000)
Maus mAk IgG ₁ anti-Aktin, Klon C4 (1:10000)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Lessard, Cincinnati, USA	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)
Maus mAk IgG ₁ anti-APAF-1 (1:250)	BD Pharmingen, Heidelberg	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)
Kaninchen pAk IgG anti-APAF-1 (1:250)	BD Pharmingen, Heidelberg	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)
Kaninchen pAk anti-Procaspase 9 –p35 (1:200)	Santa Cruz, Heidelberg	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)

Maus mAk IgG _{2b} anti-humanes Cytochrome c, Klon 7H8.2C12 (1:200)	BD Pharmingen, Heidelberg	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)
Kaninchen anti- <i>T. gondii</i> NTPase-Serum (1:2000)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Con Beckers, Chapel Hill, NC	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)
Maus Ig anti- <i>T. gondii</i> -Serum (RS 7-2) (1:2000)	Eigenherstellung	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)
Kaninchen anti- <i>Plasmodium</i> HSP70 kreuzreagierend (1:1000)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Volker Heussler, Hamburg	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)
Maus mAk IgG ₁ anti-HSP70, Klon 5A5 (1:1000)	StressMarq, Biosciences Inc., Canada	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)
Maus mAk anti-bovine Cytochrom c-Oxidase (COX), Untereinheit IV, Klon 20E8-C12 (1:250)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Meerettich Peroxidase-konjugiertes F(ab) ₂ -Fragment Ziege anti-Maus IgG (H+L)

Tab. 10: Antikörper für IFT

Primäre Antikörper/Bezeichnung (Verdünnung)	Herkunft	Sekundäre Antikörper/Bezeichnung (Verdünnung)
Anti- <i>Toxoplasma</i> Polyklonal, Kaninchen (1:1000)	Eigenherstellung	Cy TM 3-konjugiertes Esel F(ab') ₂ - Fragment anti-Kaninchen IgG (1:800)
Anti- <i>Toxoplasma</i> Monoklonal, Maus (1:100)	Eigenherstellung	Cy TM 3-konjugiertes Esel F(ab') ₂ - Fragment anti-Maus IgG (1:400)
Kaninchen anti- <i>T. gondii</i> NTPase-Serum (1:100)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Con Beckers, Chapel Hill, NC	Cy TM 2-konjugiertes Esel F(ab') ₂ - Fragment anti-Kaninchen IgG (1:50)
Kaninchen anti- <i>Plasmodium</i> HSP70 kreuzreagierend (1:100)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Volker Heussler, Hamburg	Cy TM 2-konjugiertes Esel F(ab') ₂ - Fragment anti-Kaninchen IgG (1:50)

2.1.8 Primer

Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich, München synthetisiert.

Tab. 11: Klonierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz	T_m [°C]
NTPase_IBA3_11_fwd	5'GGCGTCCTCGAGACAGACTCATCGTCACTC 3'	72
NTPase_1_IBA3_11_rev	5'GGCTGCCCATGGTTCAGATTGTGAGAATATCCCG C 3'	73
Proteo_NTPaseIF_fwd	5'AGGTCGAAGCTTCCACAGACTCATCGTCACTC 3'	74

Material und Methoden

NTPase_rev_Proteo IF2	5'TAGCTGGGGCCCTCACAGATTGTGAGAATATCCC GC 3'	71
NTPase_pQE2fwd	5'GGTAAGCTTACAGACTCATCGTCACTC 3'	65
NTPasepQE30_rev	5'GCCAAGCTTCAGATTGTGAGAATATCCCGC 3'	68
HSP70_pQE30_4fwd	5'AATGGATCCAGTGATGCGGAGGAAGGAAAAGTC AAGG 3'	72
HSP70_pQE30_4rev	5'ATCAAGCTTCTACAACCTCGTCGTGACCACCATAG TC 3'	71

Tab. 12: Sequenzierungs-und Kontrollprimer

Bezeichnung	Sequenz	T_m [°C]
NTPase_m_seq	5'ACCTCATCAACAATCCGTCGCCT 3'	62
NTPase_Trans_fwd	5'GGTGCATGATTGATGAATAC 3'	53
NTPase_Trans_rev	5'TCTCACATCTTCGTTACAG 3'	55
Proteo_Trans_fwd	5'CAAGAGACAGGATGAGGATC 3'	57
Proteo_Trans_rev	5'ATGACAGGAGATCCTGCC 3'	56
DD-Tag NTPase rev	5'CATGACCGGGTTTTCGCCAAGAA 3'	62
DD-Tag_Kontrolle_fwd	5'CGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA 3'	63
IBA3plus fwd	5'GAGTTATTTTACCACTCCCT 3'	53
IBA3plus rev	5'CGCAGTAGCGGTAAACG 3'	55

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

Alle verwendeten Zelllinien und Parasiten wurden zur Subkultivierung und während der laufenden Experimente im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in gesättigter Wasserdampfatosphäre inkubiert.

2.2.1.1 Kultivierung von L929-Fibroblasten

Als Wirtszellen für die Toxoplasmen wurden L929-Mausfibroblasten in 6-Loch-Zellkulturplatten vermehrt. Zweimal wöchentlich wurden die adhärennten Zellen mit einem Spatel vom Boden der Zellkulturplatte abgeschabt und resuspendiert. Je nach Dichte der Zellen wurden 4-6 Tropfen der Zellsuspension und etwa 4 ml frischem Medium in einer neuen 6-Loch-Zellkulturplatte subkultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

Zur Parasitenvermehrung wurden Toxoplasmen mit L929-Fibroblasten ko-kultiviert. Hierzu wurden Suspensionen von L929-Zellen und von Toxoplasmen in einer 12 Loch-Zellkulturplatte in verschiedenen Verhältnissen (6:5-2:3) gemischt und in 1 ml vorgewärmtem Medium inkubiert. Nach etwa 7 bis 10 Tagen waren alle Wirtszellen weitestgehend lysiert und die freigesetzten Parasiten konnten für Experimente oder für die erneute Subkultivierung verwendet werden.

2.2.1.3 Isolation der Parasiten

Zur Isolation der Parasiten für die Verwendung in Experimenten, mussten die Toxoplasmen weitgehend von den Wirtszellen getrennt werden. Die Kokulturen der L929-Fibroblasten und Parasiten wurden zunächst gründlich resuspendiert und anschließend bei $34 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Hierbei wurden die Wirtszellen und grobe Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand mit den verbleibenden Parasiten wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei $1314 \times g$ erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Toxoplasmen zweimal mit frischem Medium gewaschen. Die lebenden, sichelförmigen Parasiten wurden mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und auf die, für die jeweiligen Versuche benötigten Konzentrationen eingestellt.

2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Parasiten und Wirtszellen

Zum Einfrieren der Toxoplasmen wurden die Parasiten zunächst wie oben beschrieben isoliert und pro Stabilat 1×10^7 Zellen eingefroren. Das Einfriermedium bestand aus 40% RPMI und 40% FCS, dem vorsichtig 20% DMSO hinzugefügt wurde. Zellsuspension und Einfriermedium wurden behutsam in gleichen Volumina gemischt und je 1 ml in Cryoröhrchen überführt. In einem Styropor-Ständer wurden die Stabilate über Nacht bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die gefrorenen Parasiten im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kurz angetaut, zügig in 50 ml frisches Medium überführt und 10 min bei $1314 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in *Toxoplasma*-Medium resuspendiert und in mehrere T25 Flaschen mit HFF-Wirtszellen überführt. Nach vollständiger Lyse der Wirtszellen wurden die Parasiten isoliert und in L929-Fibroblasten subkultiviert. Das Einfrieren von eukaryotischen Wirtszelllinien wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Jurkat-Zellen befanden sich vor der Kultivierung in Einfriermedium bei -180°C in flüssigem Stickstoff. Die Cryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37°C angetaut, bis sich die gefrorene Zellsuspension von der Wand löste und zügig in 50 ml vorgewärmtes Medium gegeben, 5 min bei $400 \times g$ zentrifugiert und in T25 Zellkulturflaschen mit frischem Medium ausgesät. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit frischem Medium in T75 Zellkulturflaschen umgesetzt.

2.2.1.5 Kultivierung von WT-Jurkat, JMR- und F9-Zellen

Die Jurkat-Zellen wurden zweimal wöchentlich bei 400 x g sedimentiert und mit frischem Jurkat-Medium im Verhältnis 1:6 in T75 Zellkulturflaschen subkultiviert.

2.2.1.6 Kultivierung von HFF-Zellen und HeLa-Zellen

Die Zellen wurden zweimal in der Woche durch Trypsin/EDTA Behandlung vom Boden der T25 Zellkulturflaschen gelöst und bei 400 x g für 5 min sedimentiert. Nach Resuspension wurden die Zellen 1:10 mit frischem Medium in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2 Herstellung von *Toxoplasma*-Lysat

Die Herstellung von *T. gondii*-Lysat diente zur Isolation von löslichen Parasiten-Proteinen für weitere Experimente. Die Parasiten wurden in T75 Zellkulturflaschen auf HFF-Wirtszellen vermehrt. Nach Lyse der Zellen und Freisetzung der Parasiten wurde die Suspension gründlich resuspendiert und die Parasiten mittels eines Isopore-Membranfilters (3 µm Porengröße, Millipore) von den Wirtszellen getrennt. Das Parasitenfiltrat wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Anzahl der *Toxoplasmen* mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Suspension wurde anschließend bei 4 °C und 20800 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet konnte bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt werden.

Parasitenpellets aus mehreren Präparationen wurden in einer Konzentration von 5×10^8 *T. gondii*/ ml in PBS aufgenommen. Um eine erste Schädigung der Cytoplasmamembran der Parasiten zu erreichen, wurde die Suspension dreimal abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Parasiten wurden anschließend mit einem Ultraschall-Homogenisator auf Eis für 10 min bei Stufe 1-2 und einem Unterbrechungszyklus von 30% aufgeschlossen. Die Ultraschallbehandlung wurde nach einer Ruhephase von 20 min auf Eis nochmal wiederholt. Anschließend folgte eine 20-

minütige Zentrifugation bei 4 °C und 20800 x g. Die Überstände mit den PBS-löslichen Proteinen wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.1 Proteinbestimmung des *T. gondii*-Lysates

Die Proteinbestimmung wurde durchgeführt, um die Lysate (2.2.2) von verschiedenen Ansätzen für die anstehenden Versuche auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 1 mg/ml einstellen zu können. Der Proteingehalt wurde photometrisch in einer 96 Loch-Platte mit Hilfe des BCA-Proteintests (Pierce) bestimmt. Eine BSA-Konzentrationsreihe mit 200, 400, 600, 800, 1000 und 1200 µg BSA/ml diente hier als Referenz zur Erstellung einer Standardkurve. Von den Proben und den Standards wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm im Plattenphotometer bestimmt. Mit Hilfe der Werte der BSA Standards konnte eine Eichgerade erstellt werden, und anhand der Geradengleichung konnte der Proteingehalt des *T. gondii*-Lysats mit den jeweiligen gemessenen Werten für die Absorption errechnet werden. Die Einstellung der Proteinkonzentration von 1 mg/ml erfolgte daraufhin mit PBS.

2.2.3 Elektroporation von Jurkat Zellen

Um die Cytochrom c-Konzentration in Wirtszellen mittels Elektroporation artifiziell zu erhöhen, wurden für die Versuche zunächst jeweils 3×10^6 Jurkat-Zellen/ 2 ml in Zk-Schalen und frischem Jurkat-Medium ausgesät und 5:1 mit *T. gondii* infiziert. Anschließend inkubierten die Zellen für 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Die Ansätze wurden in 15 ml Falcon Röhrchen überführt und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 384 µl Medium und 16 µl Cytochrom c (10 µg/ml) resuspendiert und in kalte Elektroporationsküvetten überführt. Die Negativansätze wurden parallel nur mit 400 µl Medium versetzt. Die Elektroporation erfolgte mit dem „electro cell manipulator 600“ (BTX Electroporation System) bei 160 V und 2300 µF. Diese Bedingungen wurden in Vorversuchen erfolgreich optimiert. Danach wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert, mit 2 ml frischem Medium in neue Zk-Schalen überführt und für 1 h bei 37 °C belassen. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und in NP-40-

Lysepuffer aufgenommen. Nach Herstellung der Proteinlysate (siehe unten) wurden die Überstände im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5) analysiert.

2.2.4 Herstellung von Proteinlysaten aus Säugerzellen

2.2.4.1 Herstellung von Jurkat-Zelllysate für Caspaseaktivitätsmessungen im zellfreien System

Zur Herstellung von cytosolischem Jurkatzelleextrakt (S100-Lysat) wurde die Zellsuspension für 5 min bei 400 x g zentrifugiert, das Pellet in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Resuspension in PBS und Vitalfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellen wurden anschließend erneut pelletiert und 1×10^8 Zellen/ml in Caspase 3-Extraktionspuffer (S100-Puffer) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für eine hypotone Zelllyse für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 x durch eine 23G-Kanüle auf- und abgezogen, bis in der Kontrollfärbung mit Trypanblau 90% der Zellen lysiert waren. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, aliquotiert und das fertige Lysat bei -80 °C eingefroren.

Zur Untersuchung der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung in infizierten Zellen wurden Jurkat-Zellen mit steigenden Infektionsdosen von 10, 20 bzw. 30 Parasiten pro Wirtszelle infiziert oder nicht-infiziert belassen. Nach 24 h wurden die Ansätze in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 400 x g sedimentiert. Das Pellet wurde in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Herstellung von cytosolischem Jurkatzelleextrakt (S100-Lysat) wurde mit den Proben wie oben geschrieben verfahren. Der Überstand wurde im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5) weiter analysiert.

Extraktionspuffer für Caspase 3

(Fischer et al. 2001):

20 mM HEPES
10 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
1 mM Na-EDTA
1 mM Na-EGTA
pH 7,0 mit KOH

Extraktionspuffer für Caspase 9

50 mM HEPES
50 mM KCl
2 mM MgCl₂
0,2% CHAPS
5 mM EGTA
pH 7,5 mit KOH

Vor Gebrauch hinzu geben:

40 µl PIC-Stammlösung/ml
2 mM DTT

Vor Gebrauch hinzu geben:

40 µl PIC-Stammlösung/ml
10 µg/ml Cytochalasin B
1 mM DTT

2.2.4.2 Herstellung von NP40-Zelllysat für Caspaseaktivitätsmessungen

Die zu untersuchenden Zellen wurden für 3 min bei 3381 x g zentrifugiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext und für 5 min bei 20800 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Analyse im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5) eingesetzt.

NP-40-Lysepuffer

150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
1% Nonidet P40
pH 8,0

2.2.4.3 Herstellung von Gesamtlysat

Um die Proteinlevel der HFF- und Jurkat-Zellen nach Transfektion mittels SDS-PAGE (2.2.7) und Western Blot (2.2.9) näher zu untersuchen, wurden die Detergenz-löslichen Proteine, die in der Zelle enthalten sind, isoliert.

Die Zellen wurden dazu in Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min bei 400 x g pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde jeder Ansatz alle 15 min gründlich gevortext. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile bei 20800 x g für 5 min pelletiert, der Überstand abgenommen und bei -80 °C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

Gesamt-Zellysepuffer

1% Triton X-100

0,15 M NaCl

50 mM Tris-HCl pH 8,0

50 mM NaF

5 mM Na-Pyrophosphat

1 mM PMSF

1 mM Na-Orthovanadat

5 µg/mL Pepstatin

5 µg/mL Leupeptin

5 µg/mL Aprotinin

1 mM EDTA pH 8,0

2.2.4.4 Herstellung cytosolischer und mitochondrialer Proteinextrakte

Um eine Hemmung der Wirtszellapoptose unabhängig der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien zu analysieren, wurden jeweils 4×10^6 JMR (Caspase 9-defiziente) und F9 (Caspase 9-retransfizierte) Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden mit einer Infektionsrate von 20 Parasiten pro Wirtszelle kokultiviert. In infizierten Zellen und nicht-infizierten Kontrollansätzen wurde durch Zugabe von 1 µM Staurosporin der

mitochondriale Apoptoseweg ausgelöst. 90 und 120 min nach Staurosporinzugabe wurden die Zellen bei 400 x g für 5 min abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 30 µl PBS aufgenommen und die gleiche Menge an Digitonin in Saccharose hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 1 min und die Zellen wurden erneut bei 20800 x g für 1 min bei 4 °C zentrifugiert. Bei diesem Schritt wurden die Zellorganellen und die schwere Membranfraktion sedimentiert. Der Überstand wurde als cytosolischer Extrakt abgenommen und auf Eis gelagert. Das Pellet, bestehend aus Zellorganellen und Membranbestandteilen wurde in 50 µl RIPA-Puffer aufgenommen und für 1 min auf Eis inkubiert. Danach folgte die Zentrifugation bei 20800 x g für 1 min bei 4 °C. Der Überstand enthielt unter anderem mitochondriale Proteine und wurde zusammen mit der cytosolischen Fraktion mittels SDS-PAGE (2.2.7) und Western Blot (2.2.9) weiter analysiert.

Digitonin in Saccharose

150 µg/ml Digitonin in
500 mM Saccharose

RIPA-Puffer

0,05 M Tris-HCl pH 7,4
0,15 M NaCl
1% Triton X-100
0,5% NaDOC
0,1% SDS
174 µg/ml PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
10 µg/ml Pepstatin
1 mM Na-Orthovanadat

2.2.5 Caspase-Aktivitätstest

Das Messprinzip des Caspase-Aktivitätstests beruht darauf, dass die aktivierte Caspase von einem Caspase-spezifischen Peptidsubstrat 7-Amido-4-methylcoumarin (AMC) abspaltet. Für Caspase 3/7 ist diese Aminosäuresequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) und für Caspase 9 Leu-Glu-Val-Asp (LEHD). Die Abspaltung des AMC-Moleküls durch die Caspase wird fluoreszenzphotometrisch quantifiziert. Das gemessene Fluoreszenzsignal ist proportional

zur Anzahl der abgespalteten AMC-Molekülen und somit proportional zur Caspase-Aktivität (Fischer et al. 2001; (Hippe et al., 2009).

Zur Messung der Caspase 3/7 und Caspase 9-Aktivität wurden je 10 µl der Überstände der NP40-Lysate (2.2.4.2) aus den Elektroporationsversuchen in Triplikaten mit 90 µl Reaktionspuffer (siehe unten) mit DEVD-AMC oder LEHD-AMC in 96 Loch-Mikrotiterplatten gemischt. Freies AMC in den Proben wurde in Abständen von 5 min für 1 h bei 37 °C (Exzitation: 380/10 nm, Emission: 460 nm) im Mikroplattenleser (Victor³V) quantifiziert. Für jeden gemessenen Zeitpunkt wurde der Mittelwert der gemessenen Fluoreszenz der Triplikate ermittelt. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz wurde gegen die Zeitpunkte aufgetragen. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität in einem nahezu linearen Kurvenverlauf wurde ermittelt und als Balkendiagramm dargestellt.

2.2.5.1 Caspase-Aktivitätstest im zellfreien System

Für die verschiedenen Untersuchungsansätze im zellfreien System (cytosolischer Jurkat-Zellextrakt) inkubierten lebende Parasiten, *T. gondii*-Lysat, Bakterienlysate aus der Ultraschallbehandlung oder die rekombinanten *Toxoplasma*-Proteine pro Ansatz in 100 µl S100-Lysat. Nach 1h Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeder Ansatz in zwei verschiedene Proben zu je 38 µl aufgeteilt. Eine Probe diente dabei als Negativkontrolle und wurde mit 2 µl H₂O versetzt. In der jeweils anderen Probe wurde die Caspase-Aktivität durch Zugabe von 10 µg/ml Cytochrom c, 250 µM DTT und 250 µM dATP induziert. Die Proben wurden 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 20820 x g für 5 min. Anschließend wurde von jedem Ansatz eine Dreifachbestimmung von je 10 µl Überstand und 90 µl Reaktionspuffer mit DEVD-AMC oder LEHD-AMC in 96 Loch-Platten durchgeführt. Die fluorimetrische Messung des freien AMC wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Für die Untersuchungen zur Hydrolase-Aktivität der NTPase wurde anstelle von ATP das nicht hydrolysierbare ATP-Analogon App(NH)p in verschiedenen Konzentrationen (250 µM und 1 mM) eingesetzt.

Reaktionspuffer für Caspase-Assay	MDB-Puffer
MDB-Puffer	10 mM HEPES, pH 7
0,1 mg/ml BSA	40 mM β -Glycerophosphat
0,1% (w/v) CHAPS in MDB	50 mM NaCl
10 μ M DEVD-AMC	2 mM MgCl ₂
bzw. für Caspase 9:	5 mM EGTA
50 μ M LEHD-AMC	

2.2.6 Rekonstituiertes Testsystem (Reubold et al., 2009)

Für die Untersuchungen im rekonstituierten Testsystem wurden zwei unterschiedliche Protokolle angewandt.

1. In einem Endvolumen von jeweils 100 μ l Reaktionspuffer (50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ und 5 mM DTT) inkubierten 0,4 μ M APAF-1 und 0,2 μ M Caspase 9 mit steigenden Mengen von *T. gondii*-Gesamtlysat von 2, 5, 10, 50 bzw. 250 μ g/ml für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2 μ M Cytochrom c und 1 mM ATP zu den Ansätzen gegeben und für 15 min bei 30 °C inkubiert.

2. Um den Einfluss des Parasitenlysates auf ein schon gebildetes Apoptosom zu untersuchen, inkubierten in 100 μ l Reaktionspuffer 0,4 μ M APAF-1, 0,2 μ M Caspase 9, 2 μ M Cytochrom c und 1 mM ATP für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Zugabe von steigenden Mengen von *T. gondii*-Gesamtlysat (2, 5, 10, 50 bzw. 250 μ g/ml). Die Ansätze inkubierten zunächst für 45 min bei Raumtemperatur und anschließend für weitere 15 min bei 30 °C.

Nach Zugabe von Ac-LEHD-AFC in einer Endkonzentration von 100 μ M wurde die Caspase 9-Aktivität fluorimetrisch bestimmt. Freies AFC in den Proben wurde bei 30 °C (Exzitation: 400 nm, Emission: 505 nm) in einem „Cary eclipse“ Fluorospektrometer quantifiziert.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proteinisolate aus verschiedenen Versuchsansätzen nach Elektroporation, Transfektion, aus Jurkat- und *Toxoplasma*-Zellen, sowie gereinigte Proteine der Expressionsversuche wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und durch Western Blot (2.2.9) oder Proteinfärbung (2.2.8) weiter analysiert. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen gearbeitet.

	Trenngel (12%)	Sammelgel (4,4%)
2 M Tris-HCl pH 8,8	940 µl *	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	625 µl
10 % SDS	100 µl	50 µl
30 % Acryl-0,8 Bisacrylamid	1,94 ml	360 µl
H ₂ O bidest	2 ml	1,47 ml
10 % APS	20 µl	10 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Bromphenolblau, gesättigte Lösung	-	5 µl

*Mengenangaben pro Gel

Das Trenngel wurde in die zuvor zusammengesetzten Glasplatten des Gelsystems (Mini Protean III, BioRad, München) pipettiert und mit Propanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Propanol entfernt und zweimal mit H₂O gewaschen. Überschüssiges Wasser auf dem Trenngel wurde mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel angesetzt und auf das Trenngel pipettiert. In das Sammelgel wurde ein Gelkamm mit 10 Taschen eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel vollständig polymerisiert war, konnte das Gel mit den Proben bestückt werden. Für die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurden die jeweiligen Ansätze mit 10 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99°C aufgeköcht, kurz anzentrifugiert und in die jeweiligen Taschen des Gels überführt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA/ Gel bis die Bromphenolblaufront der Proben den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

SDS-Laufpuffer

30,3 g/L Tris
144,1 g/L Glycin
10 g/L SDS
pH 8,3-8,5 mit Glycin

SDS-Probenpuffer (2x)

40 g/L SDS
10 g/L DTT
200 mg/L Bromphenolblau
8% Glycerol
in 125 mM Tris-HCl pH 6,8

2.2.8 Coomassie-Färbung

Eine sensitive Methode, um alle aufgetrennten Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel (2.2.7) darzustellen, ist die Färbung mit Coomassie Blue. Dazu wurde das Gel nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese für 1 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach wurde es solange in Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund vollständig entfärbt und nur noch deutliche Proteinbanden zu sehen waren. Das Gel konnte nun eingescannt und digital dokumentiert werden.

Coomassie-Färbelösung

10 % Essigsäure
30 % Ethanol
0,25 % Coomassie Brilliant Blau

Entfärbelösung

10 % Essigsäure
30 % Ethanol

2.2.9 Western Blot

Zur Übertragung von Proteinen nach Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (2.2.7) auf die Nitrozellulosemembran und zur anschließenden Antikörperfärbung wurde ein Semi-Dry Blotverfahren angewandt. Dazu wurden zuvor zugeschnittene Whatman Filterpapiere in die entsprechenden Puffer getränkt und mit dem SDS-Polyacrylamidgel folgendermaßen geschichtet:

Kathode (-)

9 Filterpapiere mit 40 mM Aminocaprinsäure, 20% Methanol

SDS-Polyacrylamidgel

Nitrozellulose-Membran

3 Filterpapiere mit 25 mM Tris-HCl, 20% Methanol

6 Filterpapiere mit 0,3 M Tris-HCl, 20% Methanol

Anode (+)

Die Übertragung der Proteine erfolgte für 1 h bei 32 mA/Gel. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 2 min in Ponceau S-Lösung angefärbt, um eine gleichmäßige Proteinauftrennung und Beladung des Gels zu überprüfen. Die Membran wurde mit H₂O entfärbt und danach in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Die Blockierung erfolgte für 30 min bei RT auf dem Schüttler. Danach wurde die Färbung mit dem jeweiligen primären Antikörper (Tab. 9) in 10 ml Inkubationslösung über Nacht durchgeführt. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 5 min in Waschpuffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, welcher 1:2000 in 10 ml Inkubationslösung verdünnt wurde, erfolgte für 1,5 h auf dem Schüttler bei RT. Nachdem die Membran erneut dreimal für 5 min gründlich gewaschen wurde, wurden die beiden Komponenten der ECL-Detektionsreagenzien im gleichen Verhältnis gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Papiertuch vorsichtig abgenommen und die Membran wurde in der Geldokumentationsanlage (ImageQuant LAS-4000) exponiert. Anschließend konnte von der dargestellten Chemilumineszenz ein digitales Foto erstellt werden.

Blockierlösung für Nitrozellulosemembran

5% Magermilchpulver

0,2% Tween-20

0,02% NaN₃

in PBS pH 7,4

Inkubationslösung für Antikörper

5% Magermilchpulver

0,05% Tween-20

in PBS pH 7,4

Waschlösung für Nitrozellulosemembran

0,05% Tween-20 in PBS pH 7,4

2.2.10 Entfernung gebundener Antikörper

Um gebundene Antikörper auf der Nitrozellulosemembran zu entfernen, wurde die Membran nach einem Waschschrift mit H₂O für 5 min in 0,2 M Natronlauge inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimal für 5 min in H₂O gewaschen. Danach war die Membran vorbereitet, um weitere Proteine nach erneuter Antikörperfärbung darzustellen.

2.2.11 Immunodepletion

Zur Depletion der NTPase aus *T. gondii*-Gesamtlysat, inkubierten 50 µl des Lysats (1 mg/ml) (2.2.2) mit 5 µl bzw. 10 µl anti-NTPase-Serum für 2 h bei 4 °C im Überkopf-Rotator. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit den jeweiligen Mengen an normalem Kaninchen-Serum. Nach Zugabe von 30 µl bzw. 50 µl Protein A-Sepharose erfolgte eine erneute Inkubation der Ansätze bei 4 °C für 1,5 h im Rotator. Die Suspensionen wurden anschließend für 4 min bei 4 °C und 9400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und hiervon 20 µl mit 5 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde dreimal mit PBS gewaschen und danach mit 20 µl 1 x SDS-Probenpuffer gemischt. Nach Erhitzen für 5 min auf 100 °C und Zentrifugation bei 9400 x g für 5 min wurden die Proben zusammen mit dem depletierten Lysat mittels SDS-PAGE (2.2.7) und Western Blot (2.2.9) weiter analysiert. Der verbleibende Rest des Überstandes wurde im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5) eingesetzt.

2.2.12 Immunkopräzipitation

Durch Immunkopräzipitation von Caspase 9 und APAF-1 nach Aktivierung der Caspase-Kaskade konnte die Zusammenlagerung des Apoptosoms in Gegenwart des Parasiten näher untersucht werden. 800 µl Jurkat-Zelllysat (2.2.4.1) inkubierten mit oder ohne 8×10^7 *T. gondii* für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Proben in zwei Ansätze zu je 400 µl aufgeteilt. In einem Ansatz wurde die Caspase-Aktivität mit 10 µg/ml Cytochrom c, 250

μM DTT und $250 \mu\text{M}$ dATP induziert, der zweite Ansatz diente als Kontrollansatz und wurde mit dem identischen Volumen H_2O versetzt. Die Proben wurden für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität (2.2.5) eines jeden Ansatzes gemessen. Die restlichen $300 \mu\text{l}$ eines Ansatzes inkubierten über Nacht im Überkopf-Rotator bei 4°C mit dem entsprechenden Antikörper und $100 \mu\text{M}$ Caspase-3-Inhibitor IV (Ac-DMQD-CHO), um eine sekundäre Spaltung von APAF-1 durch die aktivierte Caspase 3 zu hemmen (Bratton et al. 2001, Lauber et al. 2001). Zu den Ansätzen wurden $40 \mu\text{l}$ von 50%-iger rProtein-A-Sepharose, die vorher mit H_2O gründlich gewaschen wurde, zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 90 min im Überkopf-Rotator bei 4°C . Anschließend wurden die Ansätze bei 4°C und $10620 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und die rProtein-A-Sepharose zweimal mit 1 ml Caspase 3-Extraktionspuffer gewaschen. Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (2.2.7) und anschließendem Western Blot (2.2.9), auf ihre Zusammensetzung mit entsprechenden Antikörpern gegen Caspase 9, APAF-1 und einem polyklonalen anti-*T. gondii*-Serum hin untersucht.

2.2.13 Immunofluoreszenztest

Zur Lokalisation von NTPase und HSP70 in *T. gondii* und eventuell in den Wirtszellen wurde ein Immunofluoreszenztest mit HFF-Zellen als Wirtszellen durchgeführt. Hierzu wurden 3×10^4 HFF-Zellen/Vertiefung in einer 24-Loch-Zellkulturplatte auf Glasplättchen ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um eine vollständige Adhäsion zu erreichen. Die Infektion der Zellen erfolgte mit jeweils 6×10^4 frisch isolierten Parasiten. Nach 24 h bzw. 48 h wurde das Medium der jeweiligen Ansätze abgesaugt und mit je $0,5 \text{ ml}$ PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 15 min bei RT in $0,3 \text{ ml}$ 4% Paraformaldehyd in $0,1 \text{ M}$ Na-Cacodylat/HCl. Anschließend wurden die Glasplättchen zweimal mit $0,5 \text{ ml}$ sterilem PBS gewaschen und für 10 min in $0,5 \text{ ml}$ 50 mM NH_4Cl in PBS inkubiert. Durch diesen Schritt konnten eventuelle Hintergrundfärbungen, die durch Fixierung mit Paraformaldehyd entstehen, reduziert werden. Um die Zellmembran für die spätere Antikörperfärbung zu permeabilisieren und unspezifische Bindestellen zu blockieren, folgte nach einem 5-minütigen Waschschrift in PBS die Inkubation der Zellen in der Permeabilisierungs- und Blockierlösung bei RT für 1 h. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit 1 ml der $0,1 \text{ mg/ml}$ Saponin

enthaltenen Waschlösung auf dem Schüttler geschwenkt. Die Glasplättchen wurden danach mit den Zellen nach unten in 30 µl der jeweiligen Antikörperlösung (Tab. 10) auf eine Parafilm-Unterlage überführt und für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in drei Schritten für jeweils 10 min gewaschen und anschließend für 1 h bei RT in 30 µl der Fluorochrom-markierten Sekundärantikörperlösung überführt. Danach wurden die Glasplättchen erneut dreimal für 10 min in Waschlösung gewaschen und anschließend für 10 min in PBS gewaschen. Zur Färbung der Gesamtpopulation der Zellen inkubierten die Ansätze für 5 min in 5 µg/ ml Propidiumjodid, welches an Nukleinsäuren bindet. Im Anschluss wurde zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Jeweils zwei Glasplättchen wurden mit den Zellen nach unten und mithilfe von 10 µl Mowiol auf beschriftete Objektträger aufgebracht. Die Trocknung erfolgte über Nacht bei 4 °C und die einzelnen Ansätze konnten anschließend durch konfokale Laserscanmikroskopie ausgewertet werden.

Inkubationslösung für IFT

0,1 mg/mL Saponin
1% BSA
in PBS pH 7,4

Permeabilisierungs-und Blockierlösung

0,1 mg/mL Saponin
1% BSA
in PBS pH 7,4

Fixierlösung

4% Paraformaldehyd
0,1 M Na-Cacodylat
auf pH 7,4 mit HCl

Waschlösung

0,1 mg/mL Saponin
PBS (1x)
pH 7,4

NH₄Cl-Lösung

50 mM NH₄Cl
in PBS

2.2.14 Transfektion

Zur Transfektion von Jurkat- und HeLa-Zellen wurde das FuGene[®]HD Transfection Reagent der Firma Roche verwendet. Dazu wurden die HeLa-Zellen zur Adhäsion 24 h vor

Beginn des Experimentes in einer Menge von $1,5 \times 10^5$ Zellen/Vertiefung einer 12 Loch-Zellkulturplatte in 1 ml vorgewärmtem HeLa-Medium und die Jurkat-Zellen am Tag der Transfektion in einer Menge von 1×10^6 Zellen/Vertiefung einer 6 Loch-Zellkulturplatte in 2 ml Jurkat-Medium mit 3% FCS ausgesät. Für beide Zelllinien wurden je zwei Ansätze mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (4:2 und 6:2) des Transfektionsreagenz [μ l] und der eingesetzten DNA [μ g] in 100 μ l des jeweiligen Mediums für 15 min bei RT vorinkubiert. Zu Beginn des Experiments wurde die FCS-Konzentration im Medium der HeLa-Zellen von 10% auf 3% FCS verringert. Der Transfektionskomplex wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Kulturplatten für 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die FCS-Konzentration im Medium für beide Zelllinien wieder auf 10% erhöht. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurde der Selektionsmarker G418 (800 μ g/ml) zum Medium hinzugeben. In den folgenden 7 Tagen wurde das Wachstum der Zellen regelmäßig überprüft und alle 3 Tage ein Mediumwechsel mit Zugabe von frischem G418 durchgeführt. Anschließend wurden die Jurkat- und HeLa-Zellen in T25 Zellkulturflaschen überführt, in gleicher Weise weiterbehandelt und bis zum Einsatz in folgenden Untersuchungen regelmäßig subkultiviert.

2.2.15 RNA-Isolierung und Reverse Transkription

Die Gesamt-RNA wurde mit dem GenElute™ Mammalian total RNA Miniprep Kit der Firma Sigma-Aldrich entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Die mRNA wurde durch reverse Transkription (RT) mit Omniscript RT der Firma Qiagen in einzelsträngige, komplementäre cDNA umgeschrieben. Die Ansätze wurden entsprechend dem Protokoll auf Eis pipettiert (siehe unten) und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die cDNA konnte bis zur Analyse mittels PCR (2.2.16.2) bei -80 °C aufbewahrt werden.

- 3 μ L 10 x RT-Puffer
- 4 μ L dNTPs jeweils 5 mM
- 0,4 μ L OligodT 50 μ M
- 1 μ L RNasin 10 U/ μ L
- 1 μ L Reverse Transkriptase
- 60 ng RNA-Template

1,6 µL PCR-geeignetes H₂O

2.2.16 Modifikation von DNA

2.2.16.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Der gewünschte *E. coli*-Stamm wurde auf einer LB-Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in 10 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika gegeben und über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Über-Nacht-Kultur in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde dann 5 min auf Eis gestellt und steril bei 4000 x g für 5 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen auf Eis belassen. Das Pellet wurde vorsichtig in 30 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 1,5 h weiter auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation bei 4000 x g für 5 min und das Pellet wurde behutsam in 4 ml kaltem TFB2-Puffer gelöst. Die Suspension wurde zu je 100 µl aliquotiert und zügig in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

TFB1-Puffer

100 mM RbCl

50 mM MnCl₂

30 mM Kaliumacetat

10 mM CaCl₂

15% Glycerol

pH 5,8, sterilfiltrieren

TFB2-Puffer

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM CaCl₂

15% Glycerol

pH 6,8, sterilfiltrieren

2.2.16.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Herstellung und Anreicherung spezifischer DNA-Fragmente für Klonierungen oder Sequenzierungen verwendet. Im

Normalfall wurde für die PCR eine *Taq*- (*Thermus aquaticus*)-DNA-Polymerase (Roche) verwendet. Die Reaktionen wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen in einem Volumen von 50 µl angesetzt und enthielten folgende Bestandteile:

DNA	2 µl
Oligonukleotide (10 mM)	je 1 µl
dNTP-Gemisch (5 mM)	2 µl
DNA-Polymerase	1 µl
Reaktionspuffer (10 x)	5 µl
H ₂ O _{dest}	38,4 µl

Die Temperaturzyklen wurden den jeweiligen Anforderungen in Bezug auf die Hybridisierungstemperatur und die Dauer der Kettenverlängerung angepasst und nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	94°C	2 min	
<hr/>			
Denaturierung	94°C	1 min	35 Zyklen
Hybridisierung	x°C	40 sec	
Kettenverlängerung	72°C	2 min	
Kettenverlängerung	72°C	10 min	

Die optimale Hybridisierungstemperatur der verwendeten Oligonukleotide wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/L \quad L: \text{Anzahl der Basen}$$

Die PCR-Produkte wurden durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.16.3 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wurden PCR-Produkte oder auch Restriktionsansätze der Größe nach aufgetrennt. Hierzu wurden 10 µl DNA-Probe mit 1 µl 10 x Probenpuffer gemischt und auf ein 1%iges Agarosegel mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 10 ml Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde in eine Tasche des Gels ein 1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für etwa 45 min. Anschließend konnte das Bandenmuster mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

2.2.16.4 DNA-Extraktion aus einem präparativen Agarosegel

Nach der Auftrennung der DNA im Agarose-Gel konnte das Bandenmuster auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Das DNA-Fragment der erwarteten Größe wurde zügig mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit laut Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die so isolierte DNA konnte nun für weitere Klonierungsschritte verwendet werden.

2.2.16.5 Enzymatischer Restriktionsverdau

Alle Restriktionsenzyme wurden entsprechend Herstellerangaben verwendet. Der Restriktionsverdau wurde in 20 µl H₂O mit 2 µg der Plasmid-DNA, 1 x NEB Puffer, 1 x BSA (optional) und 2 U des Restriktionsenzym durchgeführt. Der Reaktionsmix wurde für 3 h bei 37 °C, falls für das jeweilige Enzym keine andere Temperatur erforderlich war, inkubiert. Durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.16.3) konnte die geschnittene DNA anschließend analysiert werden.

2.2.16.6 Dephosphorylierung von DNA

Um die Selbstligation eines Vektors bei der Klonierung zu vermeiden, wurde der zuvor mit Restriktionsenzymen geschnittene Vektor dephosphoryliert. Hierzu wurde die Antarktische Phosphatase der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet.

Vektor-DNA, linearisiert	1 µg
10x Puffer	1 µl
Antarktische Phosphatase (5 U / µl)	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die Phosphatase für 5 min bei 65 °C inaktiviert. Der dephosphorylierte Vektor konnte ohne Aufreinigung direkt in die Ligation (2.2.16.7) eingesetzt werden.

2.2.16.7 Ligation von DNA

Für eine Transformation wurden der Vektor und das zu integrierende Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert und nach Dephosphorylierung des Vektors in die Ligation eingesetzt. Für die Ligation wurde die Quick Ligase der Firma New England Biolabs (NEB) verwendet. Dazu wurden Vektor und Insert DNA in einem molaren Verhältnis 1:3 mit 10 µl 2 x Quick Ligase Puffer und 1 µl Ligase (400 U/µl) versetzt und auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt. Zur Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert mitgeführt. Die Proben inkubierten bei RT für 30 min und konnten nun bis zur Transformation in *E. coli* auf Eis belassen werden.

2.2.17 Transformation in *E. coli*

Nach erfolgreicher Integration des entsprechenden Gens in den Expressionsvektor musste das Plasmid in *E. coli* eingebracht und vermehrt werden. Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli*/DH5 α für 5 min auf Eis aufgetaut. Vom Ligationsansatz (2.2.16.7) wurden 5 μ l vorsichtig zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 50 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden erneut auf Eis gestellt und anschließend mit 500 μ l LB-Medium versetzt. Nun wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 300 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Die Ansätze wurden danach bei 3318 x g für 2 min zentrifugiert und es wurden vorsichtig 500 μ l Medium abgenommen. Die verbleibenden 100 μ l Bakteriensuspension wurde vorsichtig resuspendiert und komplett auf die vorher vorbereiteten LB-Agarplatten mit den jeweiligen Selektions-Antibiotika ausplattiert. Als Kontrollplatte diente ein identisch behandelter Ansatz, allerdings wurde hier nur der geschnittene und dephosphorylierte Vektor transformiert. Die Platten wurden über Nacht umgedreht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.18 Plasmidisolierung

Zur Isolierung und Kontrolle der transformierten Plasmide aus *E. coli* wurde eine Über-Nacht-Kultur der betreffenden Transformanten in 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angezogen und bei 3381 x g für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmidisolierung erfolgte mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit. Die Plasmidisolierung wurde entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt.

2.2.19 Expression heterologer Proteine

Nach erfolgreicher Integration der Zielgene in den pQE30 Vektor wurden die Klone *E. coli*/BL21/TG_NTPase_pQE30 und *E. coli*/BL21/TG_HSP70_pQE30 in einem Kulturmaßstab von je 1 L LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 34 μ g/ml

Chloramphenicol angezogen. Nach 2%iger Animpfung aus einer 100 ml Über-Nacht Kultur wurde die Expression der Proteine mit 0,04% Glucose und 0,2% Laktose im Medium induziert. Gleichzeitig wurde immer eine Negativkultur angezogen, die nur mit dem leeren Vektor transformiert worden war (*E. coli*/BL21/pQE30). Die Kulturen wurden für 7 h im Schüttler bei 37 °C inkubiert und danach in 250 ml Zentrifugenbecher überführt. Zusätzlich wurde jeweils 1 ml Kultur abgenommen und zur späteren Analyse durch SDS-PAGE genutzt. Die Kulturen wurden für 30 min bei 7000 x g in der Avanti™ J-25 Zentrifuge (Beckman Coulter) bei 4 °C sedimentiert. Die Pellets eines jeden Klons wurden vereint und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren.

Weitere Expressionsversuche der heterologen Proteine TG_NTPase und TG_HSP70 erfolgten ebenfalls in 1 Liter LB-Kultur mit Antibiotika, wie oben beschrieben. In diesem Fall inkubierten die Kulturen bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 und wurden dann mit IPTG in einer Endkonzentration von 3 µM induziert. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen wie oben beschrieben geerntet.

2.2.20 Ultraschallbehandlung der Rohextrakte von *E. coli*/BL21/pQE30 und *E. coli*/BL21/TG_NTPase_pQE30

Zur weiteren Untersuchung der Rohextrakte von NTPase-exprimierenden *E. coli* wurden jeweils 1 ml der Expressionskultur (2.2.19) *E. coli*/BL21/TG_NTPase_pQE30 und der Negativkontrolle *E. coli*/BL21/pQE30 entnommen und für 2 min bei 2300 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit einem Ultraschall-Homogenisator auf Eis für 10 min bei Stufe 1-2 und einem Unterbrechungszyklus von 30% aufgeschlossen. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 20800 x g. Überstand und Pellet wurden getrennt aufbewahrt und im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5.1) eingesetzt.

2.2.21 Reinigung von rekombinanten Proteinen

2.2.21.1 Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Zur denaturierenden Reinigung der heterologen Proteine wurde das Protokoll „The QIAexpressionist“ von der Firma Qiagen in modifizierter Form verwendet. Durch Expression eines Fusionsproteins mit einem N-terminalen His₆-Tag konnten die Proteine mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden (2.2.21). Nitrilotriessigsäure (NTA) ist ein Komplexbildner. NTA besetzt vier der sechs Liganden-Bindestellen eines Ni-Ions, während die zwei verbleibenden Bindestellen für die Interaktion mit dem His₆-Tag unbesetzt bleiben. NTA bindet Metallionen weit stabiler als andere Komplexbildner und fixiert die Ionen auch unter harschen Bedingungen, wie zum Beispiel unter stringenten Waschbedingungen auf einer Chromatographie-Säule. Ni-NTA-Agarose besteht aus Ni-NTA, das an Sepharose®CL6B gekoppelt wurde und besitzt eine hohe Bindekapazität mit minimaler unspezifischer Bindung anderer Proteine. Die Zellpellets von *E. coli*/BL21/TG_NTPase_pQE30 und *E. coli*/BL21/TG_HSP70_pQE30 sowie der Negativkontrolle wurden 15 min auf Eis aufgetaut und mit 5 ml/g Lysepuffer versetzt. Im Überkopf-Rotator inkubierte die Zellsuspension für 4 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen bei 10000 x g für 20 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 µl Benzonase (250 U/µl) und 1 ml Ni-NTA-Agarose pro 4 ml Lysat inkubierte das Gemisch über Nacht im Überkopf-Rotator.

Anschließend wurde das Lysat in eine Reinigungssäule (BioRad) überführt, der Durchfluss wurde aufgefangen und die Agarose in fünf Schritten mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen. Danach wurde das His-getaggte Protein mit zweimal je 2 ml Elutionspuffer I (pH 5,9) und zweimal je 2 ml Elutionspuffer II (pH 4,5) über die Säule eluiert. Alle Wasch- und Elutionsprodukte wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.21.2 Reinigung unter nativen Bedingungen

Die native Reinigung der heterologen Proteine erfolgte ebenfalls nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen. Die Zellpellets wurden 15 min auf Eis aufgetaut und in 3 ml/g Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym inkubierten die Zellen für

30 min auf Eis. Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung (Sonifier 250, Branson) in zwei Zyklen für 10 min bei Stufe 1-2 und einem Unterbrechungszyklus von 30% auf Eis. Da das Lysat nach dieser Behandlung sehr viskös war, wurde zu jedem Ansatz 1 µl Benzonase (250 U/µl) hinzugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden anschließend bei 4 °C und 10000 x g für 30 min sedimentiert. Zum Überstand wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose pro 4 ml Lysat gegeben und das Gemisch inkubiert über Nacht bei 4 °C im Überkopf-Rotator. Die Reinigung erfolgte wie oben beschrieben über eine Reinigungssäule der Firma BioRad. Die Agarose wurde mit insgesamt 20 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend in fünf Schritten mit je 2 ml Elutionspuffer von der Agarose gelöst. Auch hier wurden alle Filtrate gesammelt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

**Puffer für His-Tag Reinigung
unter nativen Bedingungen**

Lysepuffer nat.

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
pH 8,0

Waschpuffer nat.

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
40 mM Imidazol
pH 8,0

Elutionspuffer nat.

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
pH 8,0

**Puffer für Reinigungen
unter denaturierten Bedingungen**

Lysepuffer den.

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Urea
pH 8,0

Waschpuffer den.

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Urea
pH 6,3

Elutionspuffer I den.

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Urea
pH 5,9

Elutionspuffer II den.

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Urea
pH 4,5

2.2.22 Entsalzung der Elutionsfraktionen

Da in den Elutionspuffern der verschiedenen Reinigungen hohe Harnstoff- oder Salzkonzentrationen vorhanden waren, die in dem nachfolgenden Caspaseaktivitätstest störten, mussten die Elutionen entsalzt werden. Hierzu wurden PD-10 Entsalzungssäulen der Firma GE Healthcare verwendet. Der Pufferaustausch erfolgte über das Gravitationsprotokoll mit 30 mM Tris, 100 mM NaCl pH 8,0. Die so behandelten Proben konnten zur weiteren Analyse im Caspase 3/7-Aktivitätstest eingesetzt werden.

2.2.23 Dialyse der Elutionsfraktionen

Eine weitere Methode, die zum Austausch der Puffer bei zu hoher Salz- oder Harnstoffkonzentrationen herangezogen wurde, war die Dialyse. Hierzu wurden Slide-A-Lyser® Dialysekassetten G2 der Firma Thermo Scientific verwendet. Der Pufferaustausch wurde über Nacht laut Herstellerprotokoll gegen 30 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0 durchgeführt. Die Dialyse erfolgte in einem Probenvolumen von 3 ml bei 4 °C. Es wurde erstmals nach 4 h ein Pufferwechsel durchgeführt und die Dialyse über Nacht fortgeführt. Nach erneutem Pufferaustausch konnten die Proben nach der Dialyse für weitere 4 h im Caspase 3/7-Aktivitätstest untersucht werden.

2.2.24 Aufkonzentration von Elutionsfraktionen

In manchen Fällen konnte nur wenig Protein während der Reinigung eluiert werden. Um in diesen Fällen die Proteinkonzentrationen zu erhöhen, wurden Vivaspin Konzentrationssäulen der Firma Satorius stedim verwendet. Die Säulen hatten eine Kapazität von 2 ml und eine Membrandurchlässigkeit (MWCO) von 10000 Dalton MWCO. Die Aufkonzentration wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.25 Expression, Reinigung und Rückfaltung der funktionellen, rekombinanten NTPase (Matoba et al., 2010)

In Zusammenarbeit mit T. Asai, Tokyo wurde das *NTPase I*-Gen aus dem *T. gondii*/RH-Stamm in den pET-11d Vektor integriert. Die Expression der *T. gondii* NTPase erfolgte in *E. coli*/BL21 Zellen in LB-Medium mit Ampicillin nach Zugabe von 0,2 mM IPTG für 2,5 h. Nach Ernte der Zellen wurde das erhaltene Pellet in Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das verbleibende Pellet, welches Einschlusskörperchen (inclusion bodies) enthielt, wurde in Waschpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 4 % Thesit-Detergenz) gewaschen und der Vorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden durch mehrere Waschschrte mit Milli Q Wasser das Thesit und andere wasserlösliche Bestandteile entfernt, das verbleibende Pellet in 50 mM Glycin-NaOH pH 10,8, 8 M Harnstoff, 10 mM Glycin-Ethyl-Ester und 1 mM EDTA aufgenommen und gegen 50 mM Glycin-NaOH pH 10,8, 10 mM Glycin-Ethyl-Ester, 1 mM EDTA, 1 mM reduziertes Glutathion und 0,6 mM oxidiertes Glutathion zur Rückfaltung dialysiert. Nach 4 h wurde für weitere 4 h gegen 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 50 mM Kaliumacetat dialysiert. Danach wurde das Protein mittels Säulenchromatographie (Toyopearl DEAE-650S und Superdex 200 pg Säulen) gereinigt und entsalzt. Die enzymaktiven Fraktionen wurden eluiert, gepoolt und in 20 mM Tris-HCl pH 7,5 umgepuffert und bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml aufkonzentriert (Amicon Ultra-4 Ultracel-10K). Die funktionelle NTPase, die im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5.1) und in der Western Blot-Analyse (2.2.9) dieser Arbeit eingesetzt wurde, befand sich zur Aufbewahrung in 20 mM Tris-HCL pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,3 M NDSB-201. Alle Komponenten dieser Pufferzusammensetzung wurden vorab im zellfreien System dieser Arbeit getestet.

2.2.26 Elektronische Datenverarbeitung

Alle Versuchsdaten und Diagramme wurden mit Excel ausgewertet und erstellt. Dort erfolgten die Berechnungen der Mittelwerte und des Standardfehlers aus der Formel

$$\text{SEM} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\sqrt{\text{Anzahl Experimente}}}$$

Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden durch den student's t-Test ermittelt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet

2.2.27 Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der Bilder dieser Arbeit erfolgte mit dem „GNU Image Manipulation Program“ GIMP Version 2.4.4.

2.2.28 Mikroskopie

Die Software Version 2.61 Build 1537 von dem konfokalen Mikroskop TCS SPII von Leica wurde für die Erstellung der mikroskopischen Bilder verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Interaktion von *Toxoplasma gondii* mit der Caspase 3/7-Kaskade im zellfreien System

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in *T. gondii*-infizierten Zellen die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Induktion des intrinsischen Apoptose-Signalweges durch den Parasiten gehemmt ist (Goebel et al., 2001; Hippe et al., 2009). Um den Einfluss des Parasiten unterhalb der Mitochondrien, also unabhängig der Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung, genauer zu untersuchen, wurde in früheren Arbeiten dieser Gruppe ein zellfreies System etabliert. Das zellfreie System ist ein *in vitro* System aus cytosolischen Extrakten von humanen, leukämischen Jurkat T-Zellen. In den Extrakten sind keine größeren Zellorganellen wie Mitochondrien oder Zellkern vorhanden, sondern sie enthalten nur die löslichen cytosolischen Proteine inklusive der Komponenten der Caspase-Kaskaden. In diesem Extrakt kann demnach kein Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Das zellfreie System beruht auf der Aktivierung der Caspase 9/Caspase 3/7 Apoptose-Kaskade durch exogen zugeführtes Cytochrom c und dATP unter reduzierenden Bedingungen. Es zeichnet sich dadurch aus, dass eine veränderte Aktivität der Caspase 9/Caspase 3/7-Kaskade weder von einer modifizierten Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien, noch von einer veränderten Genexpression abhängt (Keller et al., 2006). Von außen zugegebene lösliche Moleküle haben direkten Kontakt zu cytosolischen Komponenten der Signalkaskaden der Wirtszelle. Die Caspase-Aktivität wurde anhand der Spaltung eines Fluorochrom-gekoppelten Substrates quantitativ gemessen. Die Zugabe von Cytochrom c und dATP führte tatsächlich zu einer erhöhten DEVD-AMC-Spaltung und zeigte somit eine starke Caspase 3/7-Aktivität (Abb. 4). Nach Zugabe von steigenden Mengen an *T. gondii*-Tachyzoiten wurde die Cytochrom c/dATP-induzierte Caspase 3/7-Aktivität dosisabhängig inhibiert und 5×10^6 Parasiten/ml hemmten die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität signifikant (Abb. 4).

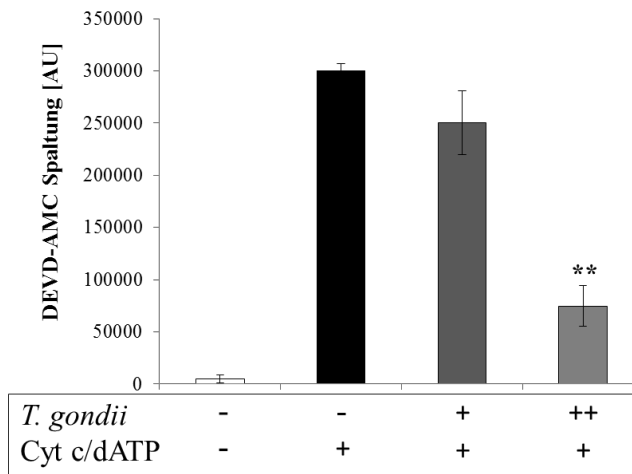


Abb. 4: Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivierung durch *T. gondii* im zellfreien System

Jeweils 1×10^5 (+) und 5×10^6 (++) Parasiten/ml von *T. gondii* Typ II NTE inkubierten in cytosolischem Jurkat-Zelllysate. Es folgte eine Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität durch Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ Cytochrom c, $250 \mu\text{M}$ DTT und $250 \mu\text{M}$ dATP. Die Caspase 3/7-Aktivität wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollansatz ohne *T. gondii* und dem Ansatz mit 5×10^6 (++) Parasiten/ml wurde durch Student's *t*-Test identifiziert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Dies bestätigten frühere Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass durch Zugabe von 1×10^7 Parasiten/ml eine Hemmung von etwa 70% und nach Zugabe von 1×10^8 Parasiten/ml die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität gar um 95% inhibiert wurde (Keller et al., 2006). Diese Resultate deuten auf eine direkte Interaktion von *T. gondii* mit den cytosolischen Komponenten der Cytochrom c-induzierten Caspase-Kaskade der Wirtszelle hin. Dieses zellfreie System wurde daher im Rahmen dieser Arbeit weiter dazu genutzt, um den Einfluss des Parasiten auf die Caspase-Aktivität näher zu untersuchen und anti-apoptische Moleküle von *T. gondii* auf ihre Bedeutung bei der Hemmung hin zu untersuchen.

3.2 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *Toxoplasma gondii* in infizierten Zellen

3.2.1 Einfluss von *T. gondii* auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität in Caspase 9-defizienten und Caspase 9-retransfizierten Zellen

Aus diesen Ergebnissen ergab sich zunächst die wichtige Fragestellung, ob die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung durch den Parasiten auch in infizierten, lebenden Zellen stattfindet und somit zur Verminderung der Wirtszellapoptose nach einer Infektion mit *T. gondii* beiträgt. Hierzu wurde die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität in Caspase 9-defizienten Zellen (JMR), in denen die mitochondrial induzierte Caspase-Kaskade unterbrochen ist und in Caspase 9-retransfizierten Zellen (F9) näher untersucht (Abb. 5A). In der Western Blot-Analyse der JMR und F9 Zellen konnte nach Antikörperfärbung mit anti-Caspase 9 wie erwartet keine Caspase 9 in den JMR-Zellen detektiert werden, während die retransfizierten F9-Zellen Caspase 9 normal exprimierten (Abb. 5B). Eine Kontrollfärbung mit einem spezifischen anti-Aktin-Antikörper zeigte eine gleichmäßige Proteinkonzentration in den Proben (Abb. 5B).

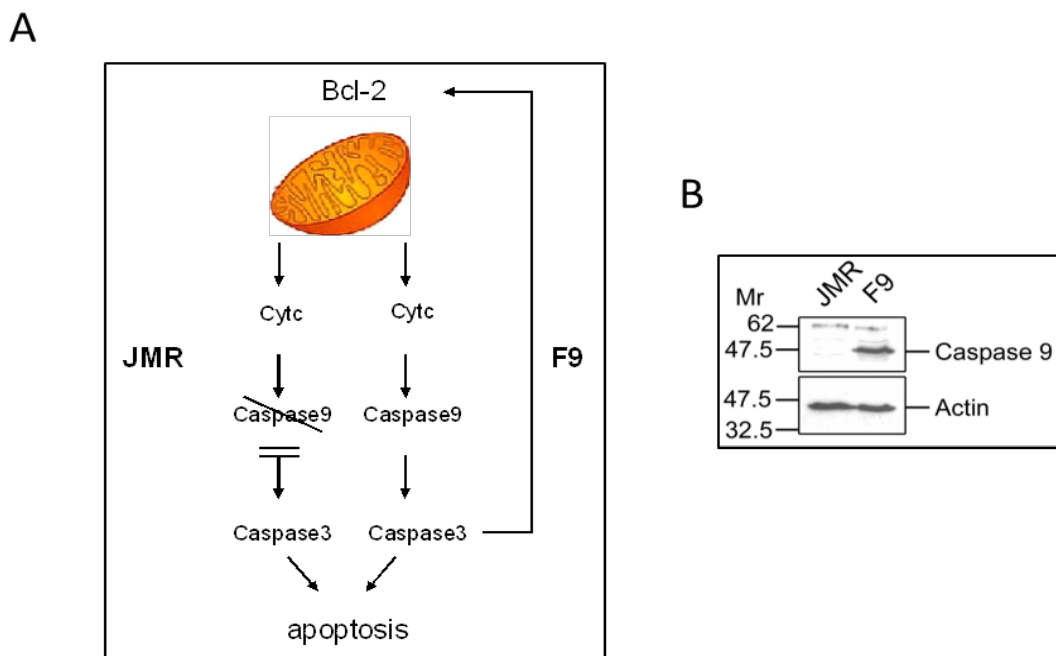


Abb. 5: Vergleichende schematische Darstellung und Western Blot-Analyse der Caspase 9-defizienten bzw. -retransfizierten Zellen

A) Schema der mitochondrialen Apoptosekaskade in Caspase 9-defizienten Zellen (JMR) und Caspase 9-retransfizierten Zellen (F9) B) SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von JMR und F9-Zelllysaten nach Färbung mit anti-Caspase 9-Antikörper und Kontrollfärbung mit anti-Aktin.

Um zu untersuchen, ob in *Toxoplasma*-infizierten Zellen unabhängig der Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien eine weitere Interaktion mit der Caspase-Kaskade der Wirtszelle durch *T. gondii* stattfindet, wurden *T. gondii*-infizierte und nicht-infizierte JMR und F9-Zellen mit 1 μ M Staurosporin behandelt, um den intrinsische Apoptoseweg in den Zellen zu induzieren. Nach 90 und 120 min wurde aus jedem Ansatz eine Digonin-lösliche (cytosolischer Extrakt) und -unlösliche Fraktion (mitochondrialer Proteinextrakt) (2.2.4.4) gewonnen. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE (2.2.7)

und Western Blot (2.2.9) analysiert. Nach anschließender Färbung mit einem Cytochrom c-spezifischen Antikörper erfolgte eine densitometrische Analyse der Bandenintensitäten der Cytochrom c-Ausschüttung. Hierbei zeigte sich in den unbehandelten Proben der JMR und F9-Zellen ein einheitlich schwacher Proteinlevel an Cytochrom c (Abb. 6A).

Die nicht-infizierten Proben der beiden Zelllinien zeigten nach Zugabe von Staurosporin und der damit verbundenen Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges eine ähnliche Zunahme der Intensität der Cytochrom c-Proteinlevel im Cytosol (Abb. 6A). Dies bestätigte frühere Untersuchungen, dass in Caspase 9-defizienten Zellen eine unveränderte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien stattfindet und auch die Expression von anderen Caspasen als Caspase 9, Proteinen der Bcl-2 Familie und Inhibitoren der Apoptose vergleichbar mit den Wildtyp Jurkat-Zellen ist (Samraj et al., 2006). In den Zellen, die mit *Toxoplasma* infiziert waren, war nach Staurosporinbehandlung die Bandenintensität von Cytochrom c im Cytosol deutlich geringer, wobei die Abnahme im Vergleich zu nicht-infizierten JMR und F9-Zellen jeweils vergleichbar war (Abb. 6A). Durch Kontrollfärbung mit einem Cytochrom c Oxidase (COX) Untereinheit IV-spezifischen monoklonalen Antikörper konnte eine mitochondriale Kontamination der cytosolischen Fraktion ausgeschlossen werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Durch die Kontrollfärbung mit einem spezifischen anti-Aktin-Antikörper wurde eine gleichmäßige Proteinkonzentration in allen Proben nachgewiesen. Die Intensitäten der Cytochrom c-Proteinlevel aus der Western Blot-Analyse mehrerer unabhängiger Experimente wurden in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Hier wurden die Intensitäten der Cytochrom c-Proteinlevel der nicht-infizierten Zellen gleich 100% gesetzt (Abb. 6B). Dabei zeigte sich in den infizierten JMR und F9-Zellen eine vergleichbare Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien von etwa 30 % im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen beider Linien. Dies konnte nun genutzt werden, um mögliche Unterschiede in den infizierten JMR und F9-Zellen bei der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung, die durch eine Interaktion des Parasiten unterhalb der Mitochondrien zustande kommt, zu analysieren.

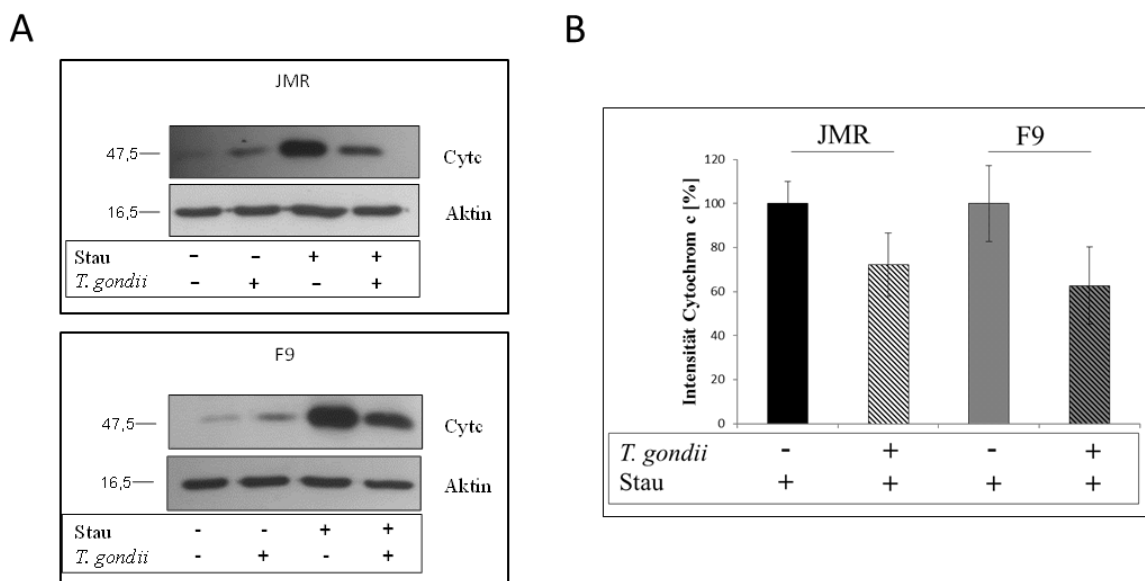


Abb. 6: Hemmung der Staurosporin-induzierten Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien von Caspase 9-defizienten und-retransfizierten Zellen durch *T. gondii*

A) Western Blot-Analyse der cytosolischen Fraktion von JMR und F9-Zellen. Diese wurden mit einer Infektionsrate 20:1 infiziert (+) oder nicht-infiziert belassen (-). Die Apoptose wurde mit 1 μ M Staurosporin (+) induziert. Cytosolische und mitochondriale Fraktionen wurden aus allen Ansätzen isoliert und mittels SDS-PAGE, Western Blot und spezifischer Antikörperfärbung analysiert. B) Die Intensitäten der Cytochrom c-Proteinbanden der cytosolischen Fraktion von infizierten (+) und nicht-infizierten (-) JMR und F9-Zellen nach Staurosporinbehandlung wurden nach Färbung mit einem Cytochrom c-Antikörper mittels densitometrischer Analyse quantifiziert. Hierbei wurden die Werte der Cytochrom c-Intensitäten mit den Werten der Aktinintensitäten ins relative Verhältnis gesetzt. Die Intensitäten der nicht infizierten Zellen (-) wurden jeweils 100% gesetzt. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM von sechs unabhängigen Experimenten dar.

Von den zu analysierenden Ansätzen wurden zeitgleich NP40-Lysate (2.2.4.2) hergestellt und diese auf ihre Caspase 3/7-Aktivität (2.2.5) untersucht. Die Werte der nicht-infizierten Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden dabei als 100% gesetzt. Es zeigte sich in den infizierten Caspase 9-retransfizierten Zellen (F9) eine deutlich stärkere Abnahme der Caspase 3/7-Aktivität nach *Toxoplasma*-Infektion als in den Caspase 9-defizienten (JMR) Zellen (Abb. 7). So wurde in den Caspase 9-defizienten JMR-Zellen die Staurosporin-induzierte Caspase 3/7-Aktivität in den infizierten Proben um etwa 30% reduziert. Dagegen betrug die Abnahme der Staurosporin-induzierten Caspase 3/7-Aktivität in den Caspase 9-retransfizierten F9-Zellen etwa 60% (Abb. 7).

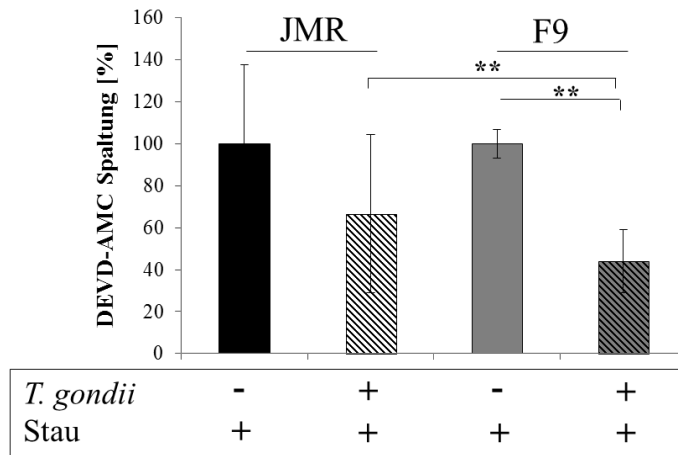


Abb. 7: Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii* in Caspase 9-defizienten (JMR) und-retransfizierten (F9) Zellen

JMR und F9-Zellen wurden mit einer Infektionsrate 20:1 infiziert (+) oder nicht-infiziert belassen (-). Apoptose wurde mit 1 μ M Staurosporin (+) induziert. Nach Herstellung von NP40 Proteinlysaten wurde die Caspase 3/7-Aktivität der verschiedenen Proben durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM von sechs unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen den nicht-infizierten und infizierten F9-Zellen, sowie zwischen den infizierten JMR und F9-Zellen wurden durch Student's *t*-Test identifiziert.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass mindestens ein Drittel des anti-apoptischen Effekts von *T. gondii* durch den Einfluss des Parasiten auf die Caspase 3/7-Aktivierung unterhalb der Mitochondrien zustande kommt.

3.2.2 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii* nach Elektroporation von Jurkat-Zellen mit Cytochrom c

Eine weitere Methode, um den Einfluss von *T. gondii* auf die Cytochrom c-induzierte Caspase3/7-Aktivität in infizierten Zellen zu untersuchen, ist die Elektroporation von Jurkat-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von Cytochrom c. Hierbei erfolgte die Apoptosehemmung durch *T. gondii* unabhängig von einer verminderten Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien. Infizierte und nicht-infizierte Jurkat-Zellen wurden in Medium mit und zur Kontrolle ohne Cytochrom c elektroporiert. Von jedem Ansatz wurde NP40-Lysat (2.2.4.2) hergestellt. Anschließend wurde die Aktivierung der Caspase-Kaskade durch das durch Elektroporation in die Zellen eingebrachte Cytochrom c mittels Caspase 3/7-Aktivitätstest (2.2.5) bestimmt. Die Auswertung ergab eine erhöhte Aktivität der Caspase 3/7 nach Elektroporation mit Cytochrom c in den nicht-infizierten Ansätzen

als in nicht-elektroporierten Kontrollzellen oder in Abwesenheit von Cytochrom c elektroporierten Zellen (Abb. 8). In den mit *T. gondii* infizierten Zellen zeigte sich nach Elektroporation mit Cytochrom c dagegen eine vollständige Hemmung der Caspase 3/7-Aktivierung (Abb. 8).

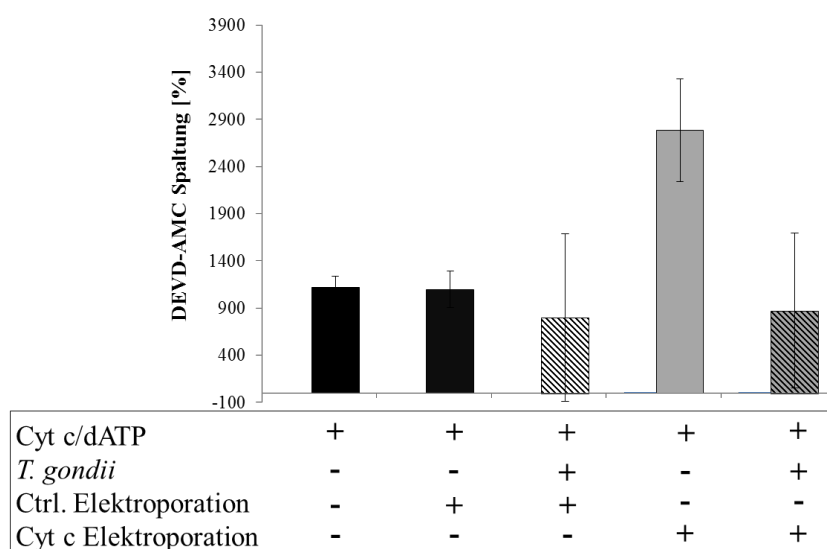


Abb. 8: Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität in *Toxoplasma*-infizierten Zellen nach Elektroporation von Jurkat-Zellen in Medium in Gegenwart und Abwesenheit von Cytochrom c

Jurkat-Zellen wurden mit einer Infektionsrate von 5:1 mit *T. gondii* infiziert (+) oder nicht-infiziert belassen (-). Die Ansätze wurden jeweils in Gegenwart (Cyt c) und Abwesenheit (Ctrl) von Cytochrom c elektroporiert. Nach Herstellung von NP40-Lysat wurde die Caspase 3/7-Aktivität der verschiedenen Proben durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten dar.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass während der Elektroporation in infizierten Zellen weniger Cytochrom c eingebracht wurde als in nicht-infizierten Zellen, wurde parallel von jedem Ansatz jeweils die Digitonin-lösliche Fraktion mit den cytosolischen Proteinen und die Digitonin-unlösliche Fraktion mit den mitochondrialen Proteinen isoliert (2.2.3). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.2.7) aufgetrennt und anschließend durch Western Blot (2.2.9) weiter untersucht. Durch Kontrollfärbung mit einem Cytochrom c Oxidase (COX) Untereinheit IV-spezifischen monoklonalen Antikörper konnte dabei eine mitochondriale Kontamination der cytosolischen Fraktion ausgeschlossen werden (Abb. 9). Nach Färbung mit einem Cytochrom c-spezifischen Antikörper zeigte sich in den Ansätzen, bei denen eine Elektroporation mit Cytochrom c erfolgt war, eine deutliche Zunahme der cytosolischen Cytochrom c-Proteinlevel. Dabei war in den Zellen, die mit

T. gondii Tachyzoiten infiziert waren der Cytochrom c-Proteinlevel nach Elektroporation mit Cytochrom c so groß wie in nicht-infizierten Zellen (Abb. 9). Durch diese Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität in infizierten Zellen hemmen kann, ohne die Menge an cytosolischem Cytochrom c zu verändern.

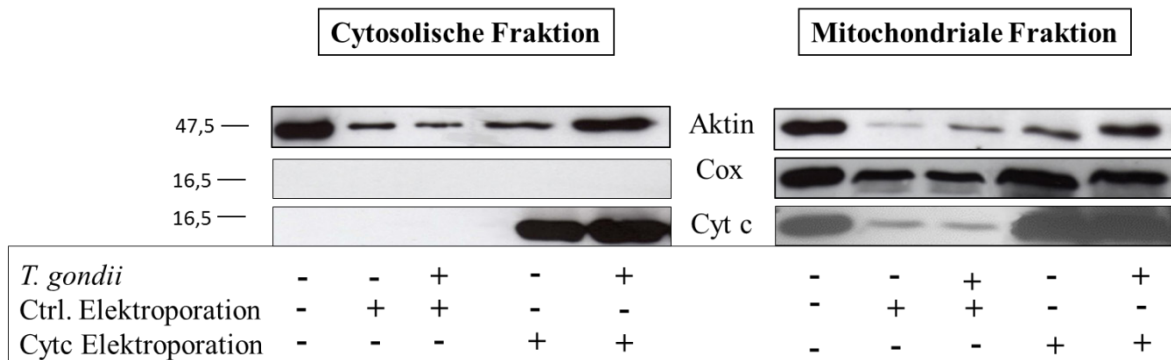


Abb. 9: Western Blot-Analyse der cytosolischen und mitochondrialen Fraktion von Jurkat-Zellen nach Elektroporation in Gegenwart und Abwesenheit von Cytochrom c

Jurkat-Zellen wurden mit einer Infektionsrate von 5:1 mit *T. gondii* infiziert (+) oder nicht-infiziert belassen (-). Die Zellen wurden anschließend jeweils in Gegenwart (Cytc) oder in Abwesenheit von (Ctrl) Cytochrom c elektroporiert. Cytosolische und mitochondriale Fraktionen wurden isoliert und mittels SDS-PAGE, Western Blot und Färbung mit einem spezifischen anti-Cytochrom c-Antikörper analysiert. Die Kontrollfärbungen erfolgten mit anti-Cytochrom c Oxidase (COX) Untereinheit IV- und anti-Aktin-spezifischen Antikörpern.

3.2.3 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität in cytosolischen Extrakten von *T. gondii*-infizierten und nicht-infizierten Jurkat-Zellen

Um eine Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii* in infizierten Zellen unabhängig von der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien weiter zu erhärten, wurde die Caspase-Aktivierung nach Zugabe von Cytochrom c zu cytosolischen Lysaten von infizierten und nicht-infizierten Jurkat-Zellen verglichen. Hierzu wurden Jurkat-Zellen mit steigenden Infektionsdosen von *T. gondii* infiziert und eine nicht-infizierte Kontrolle mitgeführt. Nach 24 h wurde aus jedem Ansatz ein cytosolischer Zellextrakt (2.2.4.1) hergestellt. In den jeweiligen Lysaten wurde die Caspase 3/7 durch Zugabe von Cytochrom c und dATP aktiviert und deren Aktivität anhand der Spaltung eines Fluorochrom-gekoppelten spezifischen Substrates quantitativ gemessen. In diesen Untersuchungen zeigte sich eine erfolgreiche Induktion der

Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität nach Zugabe von Cytochrom c und dATP verglichen mit der Negativkontrolle (Abb. 10). Nach Infektion der Zellen war dagegen mit steigenden Infektionsraten die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität dosisabhängig vermindert (Abb. 10). So konnte nach Infektion der Jurkat-Zellen mit einer Rate von 10 Parasiten pro Wirtszelle eine Verminderung der Caspase 3/7-Aktivität um etwa 10%, bei einer Infektion von 20 Parasiten pro Zelle eine Abnahme um etwa 30% und bei einer Rate von 30:1 gar eine Minderung der Caspase-Aktivität um etwa 70% nachgewiesen werden (Abb. 10). Diese Resultate verdeutlichten, dass *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität auch in infizierten Zellen hemmt und zur Verhinderung der Wirtszellapoptose nach Infektion mit dem Parasiten beiträgt.

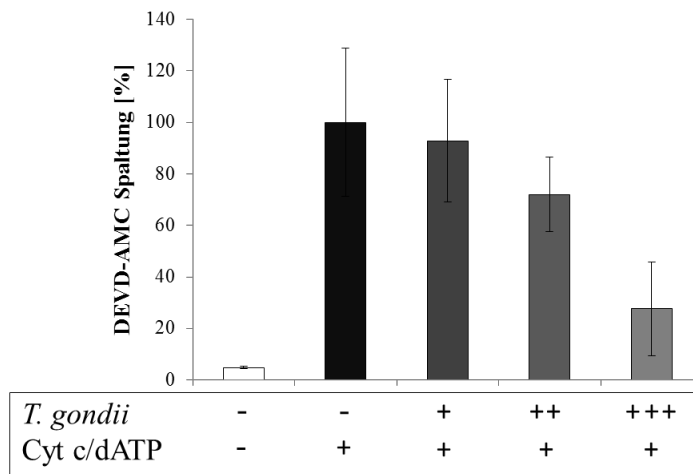


Abb. 10: Verminderte Aktivierung der Caspase 3/7 durch Cytochrom c in Lysaten *Toxoplasma*-infizierter Zellen

Jurkat-Zellen wurden im Parasit-Wirtszellverhältnis 10:1 (+), 20:1 (++) und 30:1 (+++) infiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und cytosolische Lysate hergestellt. Die Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität erfolgte durch Zugabe von 10 µg/ml Cytochrom c, 250 µM DTT und 250 µM dATP. Die Aktivität der Caspase 3/7 wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung von Caspase 3/7-spezifischem Substrat gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten dar.

3.3 Molekulare Mechanismen zur Hemmung der Apoptosombildung

3.3.1 Verminderte Bindung von Procaspase 9 an APAF-1

Bisherige Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii* sowohl in einem zellfreien System als auch in lebenden, infizierten Zellen. Um die molekularen Mechanismen der reduzierten Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System und die Stufe der Inhibierung durch *T. gondii* bei der Aktivierung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität einzugrenzen, wurde die Bindung von Procaspase 9 an APAF-1 mit Hilfe einer Immunkopräzipitation untersucht. Hierzu inkubierte Jurkat-Zelllysat mit und ohne 1×10^8 *T. gondii*/ml und es wurde durch Zugabe von Cytochrom c und dATP die Apoptosombildung induziert. Die Ansätze für die Immunkopräzipitation inkubierten in Gegenwart eines Caspase-3-Inhibitors (Ac-DMQD-CHO) mit einem spezifischen Antikörper gegen Procaspase 9. Die Immunkomplexe wurden präzipitiert und mittels Immunblot auf Procaspase 9 und APAF-1 analysiert. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass in allen Proben gleichmäßige Mengen an Caspase 9 präzipitiert werden konnten (Abb. 11). Nach Zugabe von Cytochrom c und dATP wurde erwartungsgemäß eine Bindung von Caspase 9 an APAF-1 induziert. In Gegenwart von *T. gondii* war die Bindung von Caspase 9 an APAF-1 dagegen stark vermindert (Abb. 11).

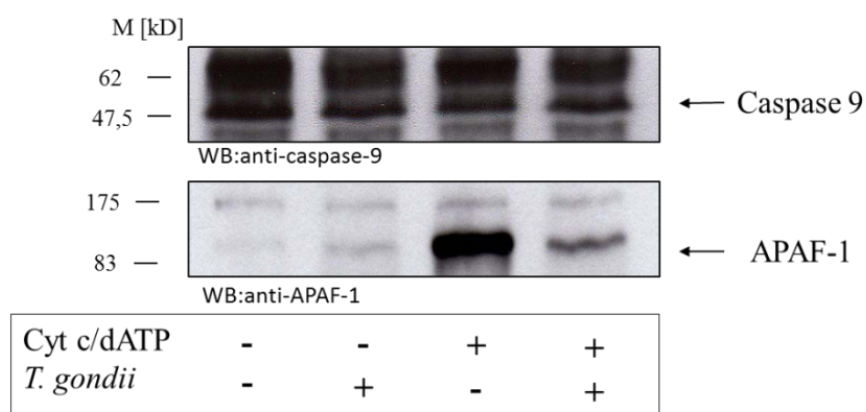


Abb. 11: Verminderte Cytochrom c-induzierte Bindung von Caspase 9 an APAF-1 in Gegenwart von *T. gondii* im zellfreien System

Jurkat-Zelllysat wurden entweder ohne (-) oder mit 1×10^8 *T. gondii*/ml (+) vorinkubiert, ehe die Apoptosombildung mit Cytochrom c und dATP (+) induziert wurde. In Gegenwart eines Caspase 3-Inhibitors (Ac-DMQD-CHO) wurde das Apoptosom mit Antikörper gegen Procaspase 9 immunkopräzipitiert und die Präzipitate mittels Western Blot und Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Procaspase 9 und APAF-1 analysiert.

Diese Ergebnisse bestätigten frühere Untersuchungen (Schaumburg, 2007) und weisen darauf hin, dass die Bindung der Procaspase 9 an das Apoptosom und in der Folge die Aktivierung der Caspase 3/7 durch den Parasiten gehemmt wird.

3.3.2 Einfluss von *T. gondii* auf die Caspase 9-Aktivität in einem rekonstituierten *in vitro*-System der Apoptosombildung

Eine weitere Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Apoptosombildung durch *T. gondii* zugrundeliegen, erfolgte in Zusammenarbeit mit Thomas Reubold und Susanne Eschenburg, Hannover. Dieser Arbeitsgruppe war es gelungen, das cytosolische Adaptorprotein APAF-1, eine Schlüsselkomponente des intrinsischen Apoptoseweges, in Insektenzellen rekombinant herzustellen und ein rekonstituiertes System der Apoptosebildung zu etablieren. Mithilfe dieses *in vitro* Systems entwickelten sie ein neues Modell über die Mechanismen des Apoptosomaufbaus von der inaktiven Form von APAF-1 hin zum Caspase-aktivierenden Apoptosom (Reubold et al., 2009). Sie verfügen somit über ein interessantes rekonstituiertes Testsystem der Apoptosombildung mit bekannter Zusammensetzung von isolierten Proteinen, d.h. von APAF-1, Cytochrom c und Caspase 9.

Dazu wurde zunächst untersucht, ob Gesamtlysat von *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität in dem von uns verwendeten zellfreien System hemmt. Hierzu inkubierten 1, 2, 5 und 10 µg *Toxoplasma*-Lysat/ml in cytosolischem Jurkat-Zelllysat. Durch Zugabe von Cytochrom c und dATP erfolgte eine deutliche Aktivierung der Caspase-Aktivität (Abb. 12A). Nach Zugabe von *Toxoplasma*-Lysat in verschiedenen Mengen wurde die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität dosisabhängig gehemmt (Abb. 12A). Da in dem rekonstituierten Testsystem der Gruppe um Susanne Eschenburg die Aktivität der Caspase 9 gemessen wird und um daher vergleichende Aussagen treffen zu können, wurde der Einfluss von *T. gondii*-Gesamtlysat auch auf die Aktivierung der Caspase 9 im zellfreien System untersucht. Dazu inkubierten ebenfalls unterschiedliche Mengen von *Toxoplasma*-Lysat von 1, 2, 5 bzw. 10 µg/ml in cytosolischem Jurkat-Zelllysat. Eine Induktion der Caspase-Aktivität erfolgte durch Zugabe von Cytochrom c und dATP (Abb. 12B). Mit Zugabe von steigenden Mengen an *T. gondii*-Lysat zeigte sich eine deutliche Hemmung der Caspase 9-Aktivität (Abb. 12B).

Somit konnte also gezeigt werden, dass Gesamtlysat von *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase 9 und Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System dosisabhängig hemmt, was frühere Ergebnisse bestätigte (Keller et al., 2006) bzw. erweiterte.

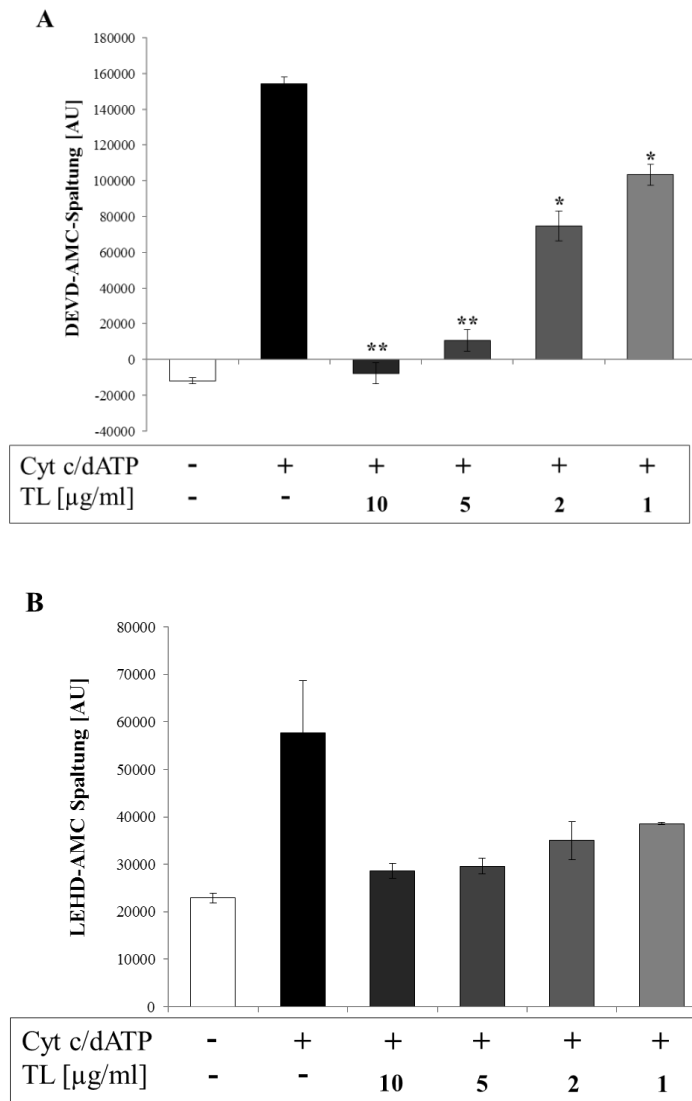


Abb. 12: Hemmung der Caspase 9 und Caspase 3/7-Aktivität durch *Toxoplasma*-Lysat im zellfreien System

Toxoplasma-Lysat in den Mengen 1, 2, 5 und 10 µg/ml inkubiert in cytosolischem Jurkat-Zelllysat. Die Induktion der Caspase-Aktivität erfolgte durch Zugabe von 10 µg/ml Cytochrom c, 250 µM DTT und 250 µM dATP. Die Caspase 3/7-Aktivität (A) und Caspase 9-Aktivität (B) der verschiedenen Proben wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC (A) und des Caspase 9-spezifischen Substrates LEHD-AMC (B) gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM von jeweils zwei unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollansatz ohne und den Ansätzen mit 1, 2, 5, bzw. 10 µg/ml *Toxoplasma*-Lysat wurden durch Student's *t*-Test identifiziert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde anschließend *T. gondii*-Lysat in dem rekonstituierten System der Gruppe um Susanne Eschenburg eingesetzt und hinsichtlich eines vermuteten Einflusses des Parasiten auf die Apoptosomformation analysiert. Die Untersuchungen wurden unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Zum einen erfolgte eine Vorinkubation von APAF-1 und Caspase 9, mit 2, 4, 10, 50 bzw. 250 µg/ml und ohne *T. gondii*-Lysat für 1 h. Anschließend wurde die Caspase-Aktivität durch Zugabe von Cytochrom c und dATP induziert und durch die Spaltung eines Fluorochromgekoppelten Substrates quantitativ gemessen (Abb. 13A). Zum anderen wurde die Caspase-Aktivität durch Zugabe von Cytochrom c und dATP vorab für 1 h induziert und erst dann erfolgte die Zugabe von 2, 4, 10, 50 bzw. 250 µg/ml *Toxoplasma*-Lysat (Abb. 13B). Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Induktion der Caspase 9-Aktivität im Testsystem. Die Caspase 9-Aktivität war nach Vorinkubation von Caspase 9 und APAF-1 mit *Toxoplasma*-Lysat dosisabhängig und ab einer Konzentration von 10 µg/ml *Toxoplasma*-Lysat signifikant gehemmt (Abb. 13A). Dies deutete darauf hin, dass eine direkte Interaktion von Parasiten Proteinen mit APAF-1 oder Caspase 9 stattfindet und somit die Apoptosombildung gestört wird. Bei den Analysen, bei denen das *Toxoplasma*-Lysat erst nach Induktion der Caspase-Aktivität hinzugegeben wurde, zeigte sich ein ebenso deutliches Bild. Nach Zugabe von steigenden Mengen an *Toxoplasma*-Lysat wurde die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität dosisabhängig gehemmt (Abb. 13B). Unter diesen Bedingungen war die Hemmung sogar noch effektiver, verglichen mit der Inhibition nach Vorinkubation mit *Toxoplasma*-Lysat. Hier hemmten schon 2 µg/ml *Toxoplasma*-Lysat die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität signifikant. Der Einsatz von höheren Mengen an *Toxoplasma*-Lysat im rekonstituierten Testsystem zeigte eine hoch signifikante Inhibition der Caspase-Aktivität. Diese Ergebnisse zeigten, dass wahrscheinlich nicht nur eine direkte Interaktion und Hemmung der Apoptosombildung stattfindet, sondern dass Parasiten-Proteine offensichtlich auch nach Bildung des Apoptosoms eine Hemmung der Caspase-Aktivierung auslösen können und das Apoptosom möglicherweise dissoziiert. Diese Ergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass eine direkte Interaktion von Parasiten-Proteinen mit den Komponenten des Apoptosoms stattfindet.

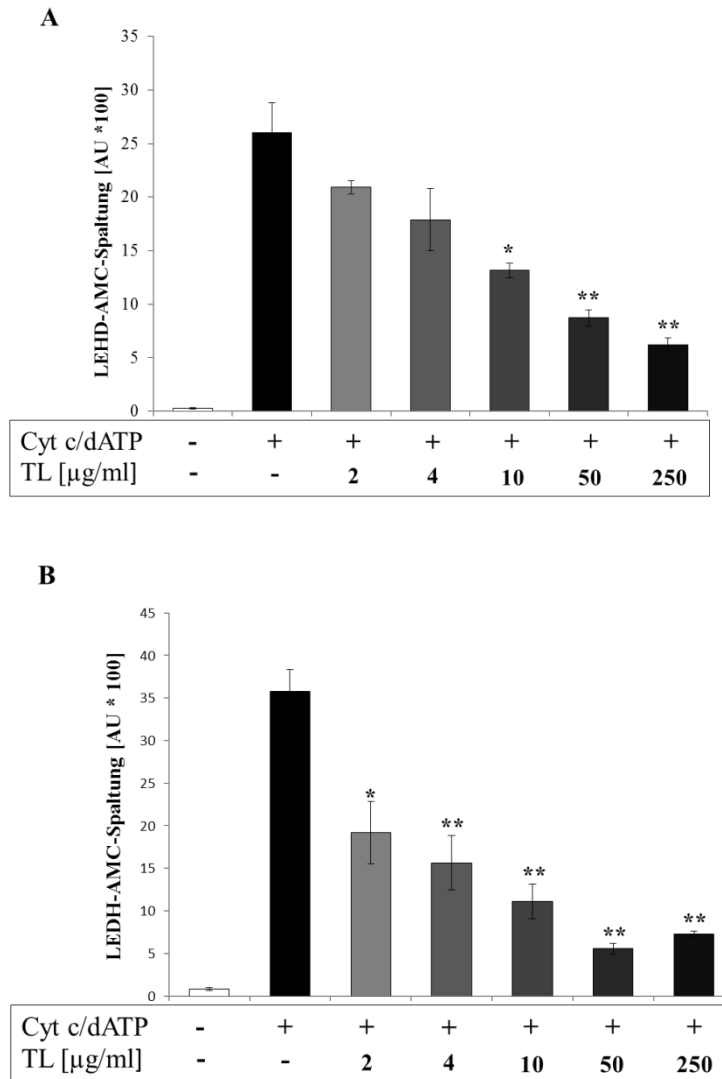


Abb. 13: Hemmung der Caspase 9 durch *Toxoplasma*-Gesamtlysat in einem rekonstituierten Testsystem der Apoptosombildung

(A) *Toxoplasma*-Gesamtlysat in den Mengen von jeweils 2, 4, 10, 50 oder 250 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert für 1 h mit 0,2 μM APAF-1 und 0,075 μM Caspase 9. Durch Zugabe von 2 μM Cytochrom c und 0,1 mM ATP wurde die Caspase-Aktivität induziert und die Aktivität der Caspase 9 durch die Spaltung eines Fluorochrom-gekoppelten Substrates quantitativ gemessen. (B) Die Caspase 9-Aktivität wurde in Ansätzen mit 0,2 μM APAF-1 und 0,075 μM Caspase 9 durch Zugabe von 2 μM Cytochrom c und 0,1 mM ATP induziert. Nach einer Stunde wurde zu den Ansätzen *Toxoplasma*-Gesamtlysat von 2, 4, 10, 50 bzw. 250 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Die Caspase-Aktivität wurde durch die Spaltung eines Fluorochrom-gekoppelten Substrates quantitativ gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollansatz ohne und den Ansätzen mit 2, 4, 10, bzw. 250 $\mu\text{g/ml}$ *Toxoplasma*-Lysat wurden durch Student's *t*-Test identifiziert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Um einen Einfluss des Parasiten auf die Apoptosombildung weiter zu untersuchen, wurde auch eine native Gelelektrophorese herangezogen. Dieses System eignet sich zur Darstellung von nativen Proteinkomplexen. Jurkat-Zelllysate wurden nach Induktion der Apoptosombildung und in Abwesenheit und Gegenwart des Parasiten durch

Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen und anschließendem Immunblot mit spezifischen Antikörpern untersucht. Diese Methode der nativen Gelelektrophorese war allerdings nicht sensitiv genug und es konnte kein Apoptosomkomplex dargestellt werden. Daher wurden diese Analysen eingestellt.

3.4 Identifizierung von parasitären Effektormolekülen im zellfreien System

Frühere Arbeiten zeigten, dass das zellfreie System geeignet ist, um Apoptose-inhibierende Effektormoleküle von *T. gondii* zu identifizieren und zu charakterisieren. Daher wurde dieses System verwendet, um parasitäre Inhibitoren der Cytochrom c/dATP-induzierten Aktivierung von Caspase 3/7 zu identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass komplexes Parasitenlysat die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System dosisabhängig hemmt (3.3.2.- Abb. 12). Nach Ionenaustauschchromatographie und Größenausschlußchromatographie von *Toxoplasma*-Gesamtlysat konnte eine Proteinfraktion isoliert werden, die die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität stark hemmte. Durch anschließende MALDI-Tof Massenspektrometrie (MS) wurden sieben Parasitenmoleküle identifiziert, die für die Hemmung der Caspase-Kaskade verantwortlich sein könnten (Schaumburg, Dissertation, Medizinische Fakultät, Göttingen). Hierbei waren vor allem *T. gondii* HSP70 (EC 3.6.1.3) und *T. gondii* NTPase (EC 3.6.1.15) vielversprechende Kandidaten für den anti-apoptotischen Effekt des Parasiten.

3.4.1 Caspase 3/7-Aktivität in Gegenwart von NTPase-depletiertem *T. gondii*-Lysat

Die NTPase ist ein Dichte Granula-Protein von *T. gondii* und hat sogenannte Apyrase-Aktivität. Das Enzym ist eine Nukleosidtriphosphat-Hydrolase mit einer breiten Substratspezifität für Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphate und kann sowohl Triphosphate (dATP), als auch Diphosphate (dADP) hydrolysieren (Asai et al., 1983). Da die Cytochrom c-induzierte Apoptosomformation ATP-abhängig ist, könnte die NTPase

von *T. gondii* ein anti-apoptotisches Molekül des Parasiten darstellen. Diese Hypothese sollte in den folgenden Untersuchungen eingehend analysiert werden.

Um den Einfluss der NTPase von *T. gondii* auf die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase 3/7 zu untersuchen, wurde zunächst eine Immundepletion der NTPase aus *T. gondii*-Lysat durchgeführt. Dafür inkubierte *T. gondii*-Gesamtlysate mit einem anti-*T. gondii*-NTPase-Serum (freundlicherweise von C. Beckers, Chapel Hill, NC, USA zur Verfügung gestellt), und durch Zugabe von rProtein-A-Sepharose und anschließender Zentrifugation konnte die NTPase aus dem Lysat entfernt werden. Der depletierte Überstand des Lysates und das verbleibende Immunkomplex-Gemisch wurden mittels SDS-PAGE (2.2.7) und Western Blot (2.2.9) analysiert. Ein Ansatz mit normalem Kaninchen-IgG diente hierbei nach identischer Versuchsdurchführung als Kontrolle. Die Western Blot-Analyse zeigte eine erfolgreiche Verringerung der NTPase-Konzentration im Überstand nach erfolgter Depletion und eine deutliche Anreicherung der *T. gondii* NTPase im verbleibenden Pellet (Abb. 14). In den Kontrollansätzen mit normalem Kaninchen IgG hatte sich an der NTPase-Verteilung in Überstand und Pellet dagegen keine Veränderung gezeigt (Abb. 14).

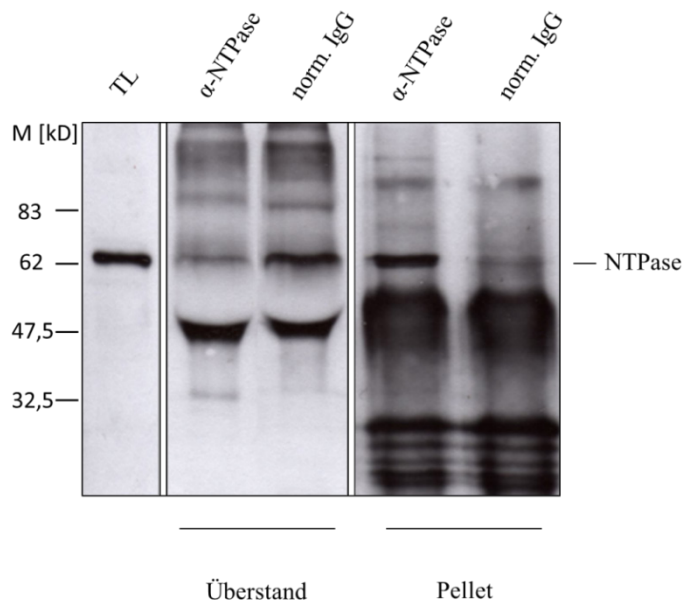


Abb. 14: Immundepletion von *T. gondii*-NTPase aus *Toxoplasma*-Gesamtlysate

T. gondii-Gesamtlysate inkubierte mit einem anti-*T. gondii*-NTPase-Serum (α -NTPase) und durch Zugabe von rProtein-A-Sepharose und anschließender Zentrifugation konnte die NTPase aus dem Lysat entfernt werden. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der mit normalem Kaninchen IgG (norm. IgG) inkubierte. Nach Immundepletion von *T. gondii*-NTPase und Kontrolldepletion wurden Überstand und Pellet der jeweiligen Ansätze mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender NTPase-spezifischer Immunfärbung analysiert. Zur Kontrolle wurde *Toxoplasma*-Lysate (TL) parallel aufgetrennt und analysiert.

Das NTPase-depletierte *Toxoplasma*-Lysat sowie das *Toxoplasma*-Lysat nach Kontrolldepletion wurden anschließend auf ihren Einfluss auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5) weiter untersucht. Als zusätzliche Positiv-Kontrolle im Test diente nicht-behandeltes *T. gondii*-Lysat. Nach Induktion der Caspase 3/7-Aktivität durch Zugabe von Cytochrom c und dATP zeigte sich eine deutliche Aktivierung der Caspase 3/7 im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle (Abb. 15). Nach Präinkubation des Jurkat-Lysates mit 5 µg/ml *Toxoplasma*-Gesamtlisat war die Cytochrom c/dATP-induzierte Caspase 3/7-Aktivität dagegen signifikant vermindert. *Toxoplasma*-Lysat, das mit normalem Kaninchen-IgG behandelt worden war (Kontrolldepletion), hemmte die Caspase 3/7-Aktivität ebenso stark wie unbehandeltes Gesamtlisat. Dies bestätigte, dass der Depletionsvorgang als solcher keinen Einfluss auf die Hemmung der Caspase-Aktivierung durch *Toxoplasma*-Lysat besaß. Nach Depletion mit einem NTPase-spezifischen Antikörper wurde diese Hemmung durch das Parasitenlysat allerdings fast vollständig aufgehoben (Abb. 15).

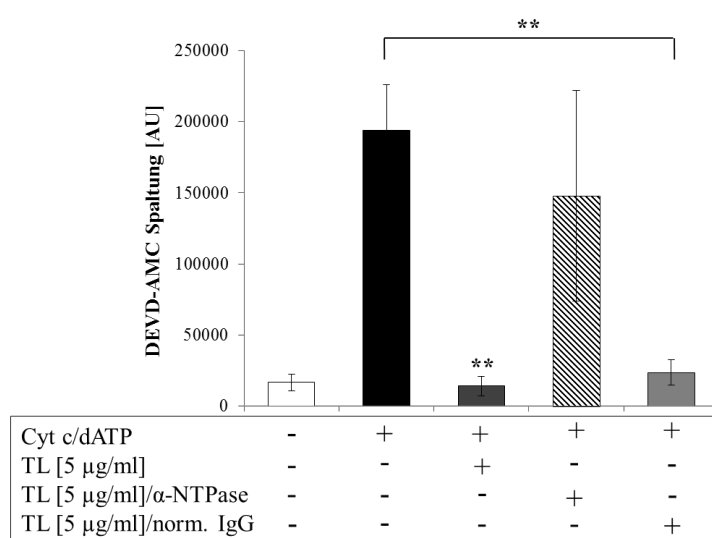


Abb. 15: Effekt einer NTPase-Depletion auf die hemmende Wirkung von *Toxoplasma*-Lysat bei der Caspase 3/7-Aktivierung

Aus Gesamtlisat von *T. gondii* wurde die NTPase mit einem anti-*T. gondii*-NTPase Antikörper depletiert. Als Kontrolle diente eine Depletion mit normalem Kaninchen-IgG. Unbehandeltes *Toxoplasma*-Lysat, Überstand der Kontrolldepletion und NTPase-depletierter Überstand inkubierten 1 h in Jurkat-Zelllysat. Es folgte eine Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität durch Zugabe von 10 µg/ml Cytochrom c, 250 µM DTT und 250 µM dATP. Die Caspase 3/7-Aktivität wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten dar. Unterschiede zwischen dem Kontrollansatz ohne und den Ansätzen mit 5 µg/ml *Toxoplasma*-Lysat und 5 µg/ml *Toxoplasma*-Lysat/norm IgG wurden durch Student's *t*-Test identifiziert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Diese Ergebnisse waren ein wichtiger Hinweis, dass der NTPase von *T. gondii* eine bedeutende Rolle bei der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch den Parasiten zukommt.

3.4.2 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch Vertreter aller klonalen Linien von *T. gondii*

T. gondii wird hauptsächlich in drei klonale Linien eingeteilt, die zu etwa 95% genetisch identisch sind. In Europa und Nordamerika kommen Toxoplasmen vom Typ II bei weitem am häufigsten vor. Trotz der genetischen Identität unterscheiden sich diese Linien in Bezug auf ihre Virulenz. Parasiten des Typ I sind in der Maus die virulentesten Stämme von *T. gondii* (Sibley and Ajioka, 2008). Die Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPase EC 3.6.1.15) von *T. gondii* kommt in zwei Isoformen, NTPase I und NTPase II, vor (Asai et al., 1995; Asai et al., 2002). Die beiden Isoformen haben eine nahezu identische Molekularmasse und bestehen aus vier identischen Untereinheiten von jeweils 66 kDa. Die NTPase I und NTPase II unterscheiden sich lediglich in 16 von 628 Aminosäuren. NTPase II wurde in allen *T. gondii* Stämmen beschrieben, während NTPase I nur den virulenten Typ I-Stämmen zugeschrieben wird (Asai et al., 1995). Nach neueren Sequenzanalysen muss diese Zuordnung allerdings in Frage gestellt werden, da die NTPase I auch in Maus-avirulenten *Toxoplasma*-Stämmen vorzukommen scheint (www.ToxoDB.org). Da in dieser Arbeit der NTE-Stamm, u.a. auch zur Klonierung der NTPase verwendet wurde und dieser zu den Typ II-Stämmen zählt, war es dennoch wichtig herauszufinden, ob die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität durch Vertreter aller klonalen Linien von *T. gondii* vergleichbar gehemmt wird. Im Hinblick auf die oben dargestellten deutlichen Hinweise, dass die NTPase ein Kandidat für den anti-apoptischen Effekt des Parasiten darstellt, sollte also auch untersucht werden, ob bei der Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität die jeweilige Isoform des Enzyms eine Rolle spielt. Hierzu wurden jeweils zwei Vertreter der klonalen Linien I, II und III von *T. gondii* im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5) auf ihren Effekt auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität hin untersucht. Die Vertreter des klonalen Typs I waren *T. gondii*/RH und *T. gondii*/BK, zu den Typ II-Stämmen gehörten *T. gondii*/NTE und *T. gondii*/ME49 und als Typ III-Stämme wurden *T. gondii*/CEP und *T. gondii*/C56 verwendet. Jeweils 1×10^5 und 5×10^6 Parasiten/ml inkubierten in Jurkat-Zelllysate. Die Induktion der Caspase 3/7-Aktivität erfolgte durch

Zugabe von Cytochrom c und dATP. Die Experimente zeigten hierbei eine starke Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität in Abwesenheit von *T. gondii* (Abb. 16). Alle getesteten *Toxoplasma*-Stämme verminderten die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität dosisabhängig (Abb. 16). Der Typ I-Stamm *T. gondii*/BK inhibierte die Caspase 3/7-Aktivität dabei stärker als die anderen Parasitenstämme und 1×10^5 Parasiten/ml hemmten die Caspase 3/7-Aktivität signifikant. Da jedoch der Typ I-Stamm *T. gondii*/RH die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität ähnlich stark hemmte wie die Typ II und Typ III-Stämme, handelte es sich nicht um einen Typ I-spezifischen Effekt. Zusammengefasst wurde also eine vergleichbare Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch Vertreter der klonalen Linien I bis III von *T. gondii* nachgewiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse war davon auszugehen, dass bei der Hemmung der Caspase-Aktivität Unterschiede hinsichtlich der Expression der Isotypen I und II der NTPase keine deutliche Rolle spielt.

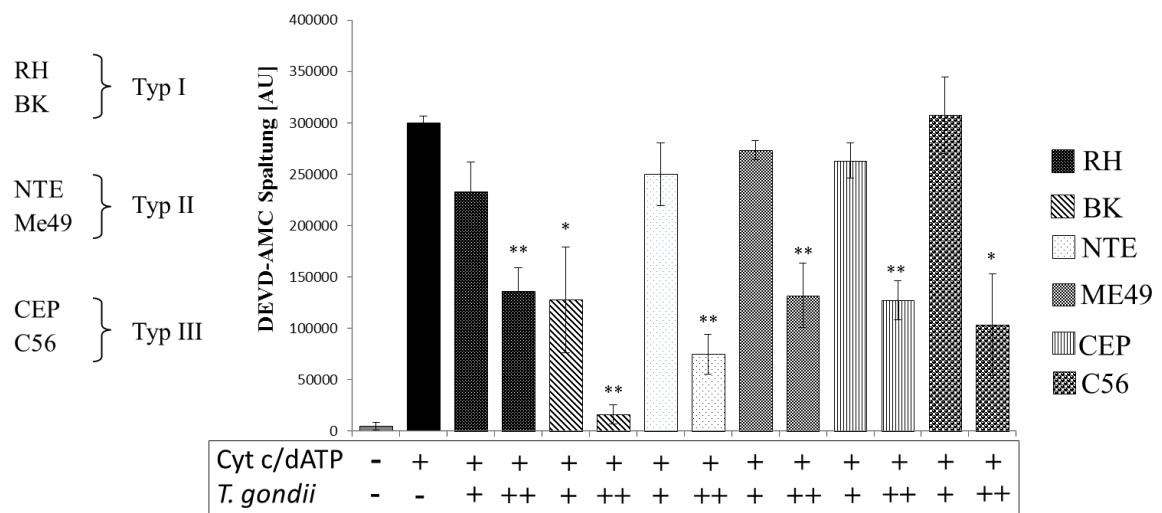


Abb. 16: Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch Vertreter aller drei klonalen Linien von *T. gondii* im zellfreien System

Jeweils 1×10^5 (+) und 5×10^6 (++) Parasiten/ml der drei klonalen Linien von *T. gondii* (Typ I: RH und BK, Typ II: NTE und ME49, Typ III: CEP und C56) inkubierten in Jurkat-Zelllysat. Es folgte eine Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität durch Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ Cytochrom c, $250 \mu\text{M}$ DTT und $250 \mu\text{M}$ dATP. Die Caspase 3/7-Aktivität wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollansatz ohne *T. gondii* und den Ansätzen mit 1×10^5 (+) und 5×10^6 (++) Parasiten/ml wurden durch Student's *t*-Test identifiziert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.4.3 Effekt von App(NH)p auf die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii*

Es sind mehrere Mechanismen denkbar, wie die NTPase die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität hemmen kann, zum einen beispielsweise über die Hydrolase-Aktivität des Enzyms oder zum anderen über eine sterische Hemmung. Darum stellte sich die Frage, ob die Enzymaktivität der NTPase für den anti-apoptotischen Effekt verantwortlich ist, oder ob die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität eventuell durch Bindung des Enzyms an Komponenten des mitochondrialen Apoptoseweges zustande kommt. Um diese Frage zu untersuchen, wurde die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch *Toxoplasma*-Lysat im zellfreien System in Gegenwart eines nicht-hydrolysierten ATP-Analogons (App(NH)p) untersucht. Hierzu inkubierten Ansätze mit und ohne 10 µg/ml Parasitenlysat, in denen die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität jeweils in Gegenwart von 0,25 und 1 mM ATP bzw. App(NH)p induziert wurden. Die Caspase 3/7-Aktivitätstests zeigten eine deutliche Aktivierung der Caspase-Aktivität nach Induktion mit Cytochrom c und dATP (Abb. 17). Die Caspase-Aktivität wurde durch Cytochrom c in Gegenwart von App(NH)p zwar deutlich, aber dennoch weniger stark induziert im Vergleich zu den Ansätzen mit dATP. *Toxoplasma*-Lysat zeigte jedoch unabhängig davon, ob dATP oder das ATP-Analogon App(NH)p in den Ansätzen vorhanden war, eine fast vollständige Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität (Abb. 17). Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass auch nach Induktion der Caspase 3/7-Aktivität mit Cytochrom c und einem nicht hydrolysierten ATP-Analogon die Hemmung der Caspase-Aktivität durch Zugabe von *T. gondii*-Lysat stattfindet. Eine fast vollständige Hemmung zeigte sich auch nach Zugabe der vierfachen Menge an ATP, also einem Überschuss. Dies wies darauf hin, dass die Hydrolase-Aktivität der NTPase für die Hemmung der Caspase-Aktivität nicht benötigt wird, stattdessen könnten andere Mechanismen die Hemmung der Caspase-Aktivierung durch die NTPase vermitteln, beispielsweise durch Bindung des Proteins an Komponenten des intrinsischen Apoptoseweges.

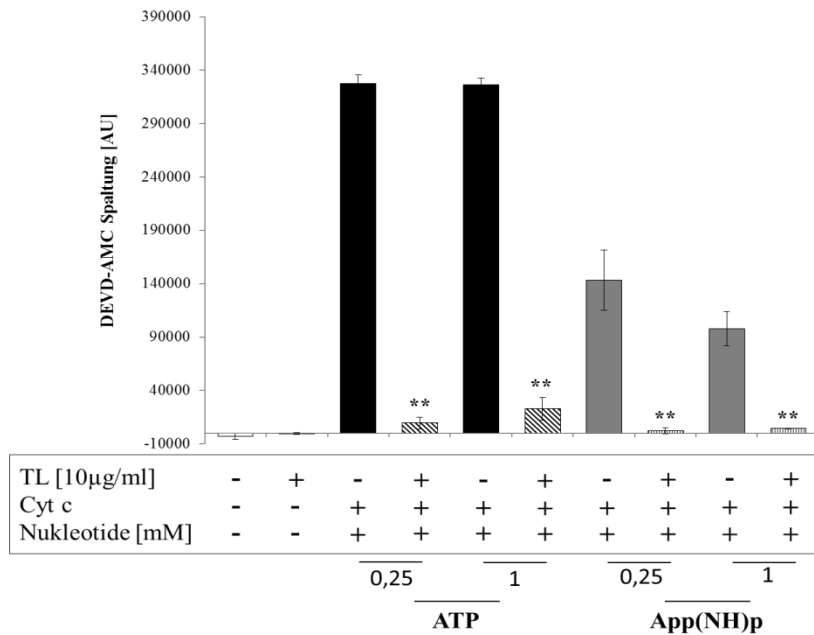


Abb. 17: Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii*-Lysat in Gegenwart von nicht-hydrolysierbarem ATP-Analogon

Jurkat-Zelllysate inkubiert mit (+) oder ohne (-) 10 µg/ml *Toxoplasma*-Lysat. Die Aktivierung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität erfolgte zum einen mit Cytochrom c und 0,25 bzw. 1 mM dATP, zum anderen mit Cytochrom c und 0,25 bzw. 1 mM App(NH)p. Die Caspase 3/7-Aktivität wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen, die mit *Toxoplasma*-Lysat und ohne inkubierten, wurden durch Student's *t*-Test identifiziert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.5 Einfluss rekombinant exprimierter *T. gondii* NTPase und HSP70 auf die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase 3/7 im zellfreien System

3.5.1 Herstellung der rekombinanten Proteine *T. gondii* NTPase und HSP70 in *E. coli*/DH5α Zellen

Die massenspektrometrischen Analysen des *Toxoplasma*-Lysates hatten auch *T. gondii* HSP70 als möglichen anti-apoptischen Kandidaten identifiziert. Es ist bekannt, dass HSP70 die Apoptose in Säugerzellen verhindern kann. Untersuchungen haben ergeben, dass HSP70 an APAF-1, der Schlüsselkomponente des mitochondrialen Apoptoseweges, bindet und somit die Cytochrom c und dATP-vermittelte Aktivierung von Procaspase 9 unterbinden kann (Hwang et al., 2010). Um einen möglichen Einfluss von *T. gondii* HSP70

auf die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität näher zu untersuchen, und aufgrund der deutlichen Hinweise auf eine Beteiligung der *T. gondii* NTPase an der Hemmung der Cytochrom c/dATP-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii*, wurden die Proteine rekombinant hergestellt. Zur Klonierung wurde der pQE30 Expressionsvektor der Firma Qiagen verwendet. Für eine Reinigung der Proteine kodiert der Vektor für einen Fusions-His₆-Tag, der N-terminal an die zu exprimierenden Proteine angehängt ist. Die Sequenzen der *T. gondii*-Gene wurden der Datenbank www.ToxoDB.org entnommen und geeignete Klonierungsprimer mit Schnittstellen für passende Restriktionsenzyme abgeleitet.

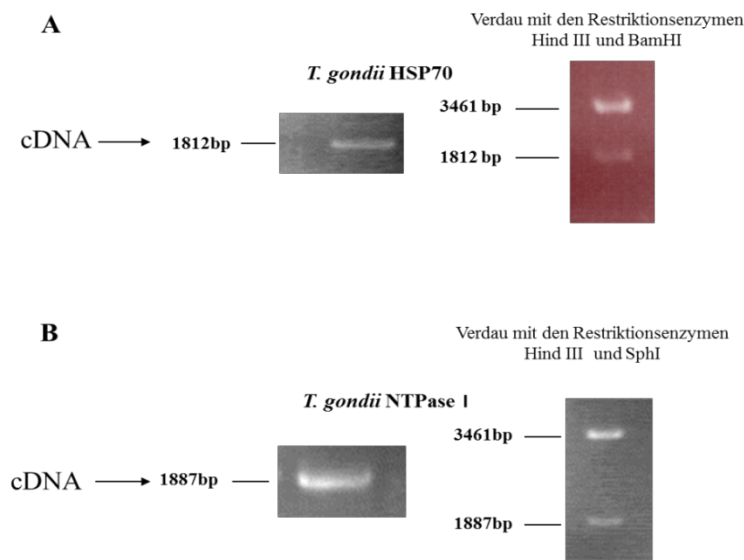


Abb. 18: Amplifikation und Restriktionsverdau der Plasmide pQE30/HSP70 und pQE30/NTPase

Die Gensequenzen der Gene *HSP70* (A) und *NTPase* (B) von *T. gondii* wurden der *Toxoplasma*-Datenbank (www.ToxoDB.org) entnommen. Es folgte eine RNA-Isolation aus *T. gondii* Tachyzoiten. Nach reverser Transkription wurden die cDNAs mittels PCR amplifiziert. Nach Ligation in den pQE30-Vektor und Transformation des Konstrukts in *E. coli*/DH5 α wurden die Plasmide mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam HI für *T. gondii* HSP70 sowie Hind III und Sph I für *T. gondii* NTPase verdaut. Zur Kontrolle der Fragmente wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Die *NTPase* und *HSP70*-DNA-Fragmente wurden jeweils in den pQE30-Vektor ligiert (2.2.16.7) und das erhaltene Plasmid in den *E. coli*/DH5 α -Stamm transformiert (2.2.17). Die jeweiligen positiven Klone *E. coli*/DH5 α /NTPase und *E. coli*/DH5 α /HSP70 wurden angezogen und die entsprechenden Plasmide isoliert (2.2.18). Durch DNA-Sequenzierung (Firma Seqlab, Göttingen) wurden die Konstrukte auf die korrekte Gensequenz und die richtige Orientierung der Gene im Vektor hin überprüft. Außerdem zeigte der Kontrollverdau der Plasmid-DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen DNA-

Fragmente für Vektor und Insert in den erwarteten Größen (Abb. 18). Die Plasmide wurden anschließend in den Expressionsstamm *E. coli*/BL21 transformiert (2.2.17). Dieser Stamm enthält den lysogenen Bakteriophagen DE3, der für die T7 RNA-Polymerase kodiert. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors ist in das *int*-Gen des λ -Phagen inseriert. Da dieses *int*-Gen somit inaktiviert ist, benötigt DE3 zur Exzision oder Integration einen Helferphagen (Studier, Rosenberg et al. 1990).

3.5.2 Expression der rekombinanten Proteine NTPase und HSP70

Durch Zugabe von IPTG wird normalerweise die T7-RNA-Polymerase und dadurch die Expression der Zielgene induziert. In dieser Arbeit konnte allerdings keine ausreichende Expression der Gene unter Einsatz dieser Methode erreicht werden und dementsprechend wurde das Expressionssystem gewechselt. Die Expression von *T. gondii* HSP70 und *T. gondii* NTPase wurde durch Zugabe von 0,04% Glukose und 0,2% Laktose im Medium induziert. Die Kulturen wurden für insgesamt 6 Stunden bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach 4 Stunden und dann nach jeder folgenden Stunde wurden Proben entnommen und die Expression mittels SDS-PAGE (2.2.7) und Western Blot (2.2.9) analysiert. Als Negativkontrolle dienten *E. coli*/BL21 Zellen, die mit dem leeren pQE30-Vektor transformiert worden waren. Nach Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen HSP70 und NTPase konnte in der Western Blot-Analyse eine starke Expression von *T. gondii* HSP70 und eine deutliche Expression der *T. gondii* NTPase in der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Abb. 19). In der Negativkontrolle war dagegen kein Protein der entsprechenden Größe nachweisbar. Da eine leichte Zunahme des Proteinlevels mit zunehmender Expressionszeit erkennbar war (Abb. 19), wurden in den folgenden Versuchen *E. coli*-Zellen 6 h nach Induktion der Proteinexpression verwendet.

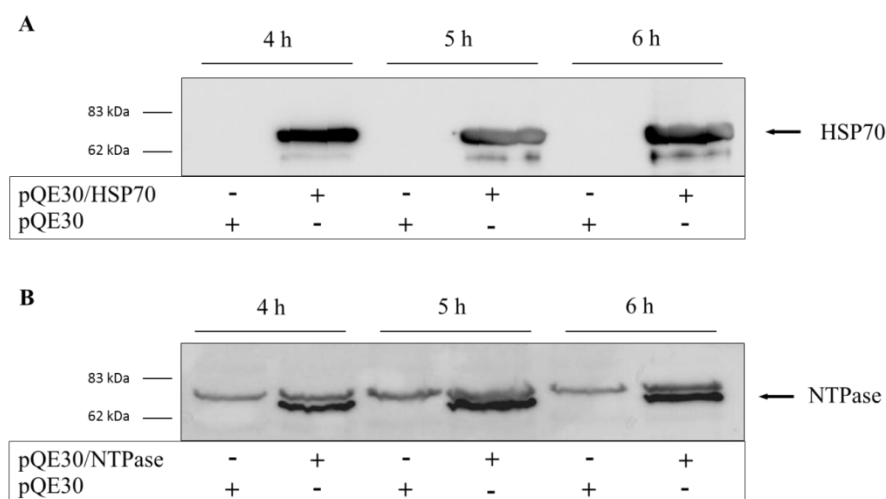


Abb. 19: Heterologe Expression von *T. gondii* NTPase und *T. gondii* HSP70 in *E. coli*

In *E. coli*/BL21/pQE30/NTPase, *E. coli*/BL21/pQE30/HSP70 und der Negativkontrolle *E. coli*/BL21/pQE30 wurde die Expression mit 0,04% Glukose und 0,2% Laktose im Medium induziert. Nach 4 h und nach jeder weiteren Stunde wurde 1 ml Bakterien-Kultur abgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. *T. gondii* HSP70 oder *T. gondii* NTPase wurden nach Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern und HRP-konjugierten Sekundärantikörpern nachgewiesen.

3.5.3 Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch Rohextrakte aus NTPase-exprimierenden *E. coli*/BL21 Zellen nach Ultraschallbehandlung

Um zu untersuchen, ob Rohextrakte von *T. gondii* NTPase-exprimierenden *E. coli* einen Einfluss auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität hatten, wurden *E. coli*/BL21/NTPase und *E. coli* Zellen, die mit dem leeren Vektor transformiert worden waren, in Literkulturen angezogen und die Expression durch Glukose und Laktose im Medium induziert. Vor dem Ernten der Zellen wurde je 1 ml von der Bakterien-Kultur abgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (2.2.20). Der Überstand und das verbleibende Pellet wurden mittels SDS-PAGE (2.2.7) und Western Blot (2.2.9) analysiert. Nach der Färbung mit einem spezifischen anti-NTPase Antikörper konnte das rekombinante Protein im Überstand schwach, im Pellet dagegen deutlich nachgewiesen werden (Abb. 20). Hier zeigte sich auch eine zusätzliche Proteinbande, welche sich kurz über der Proteinbande der NTPase im Western Blot befand. Dabei scheint es sich um ein kreuzreagierendes Protein zu handeln, da es auch in *E. coli*, die mit dem leeren Vektor transformiert waren, nachgewiesen wurde.

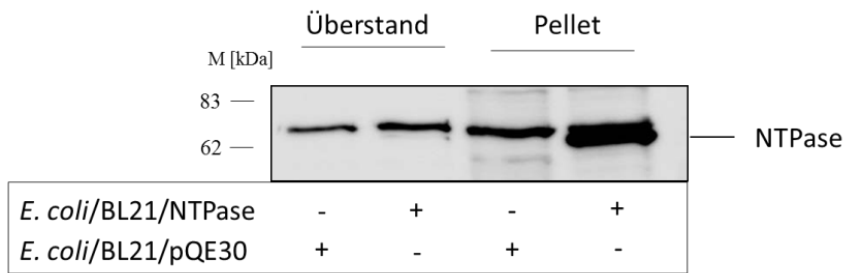


Abb. 20: Nachweis von *T. gondii* NTPase in Überstand und Pellet von rekombinanten *E. coli* nach Ultraschallbehandlung

Die Zellen von NTPase-exprimierenden *E. coli*/BL21/NTPase und von der Negativkontrolle *E. coli*/BL21/pQE30 wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und Überstand und verbleibendes Pellet durch SDS-PAGE, Western Blot und anschließende NTPase-spezifische Immunfärbung analysiert.

Das resuspendierte Pellet sowie der Überstand von Ultraschall-behandelten NTPase-exprimierenden *E. coli* und Negativkontrolle wurden anschließend auf einen hemmenden Effekt auf die Caspase 3/7-Aktivität im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5) untersucht. Hierzu inkubierten jeweils 1, 5 und 10 μ l vom Überstand und vom resuspendierten Pellet des NTPase-enthaltenden Extraktes und des Kontrolleextraktes in Jurkat-Zelllysate. Nach Zugabe von Cytochrom c und dATP zeigte cytosolischer Extrakt von Jurkat-Zellen in Abwesenheit von *E. coli*-Extrakt erwartungsgemäß eine starke Induktion der Caspase 3/7-Aktivität. In Jurkat-Zelllysaten, die mit Überstand und Pellet des NTPase-enthaltenden *E. coli*-Extraktes inkubierten, war die Cytochrom c/dATP-induzierte Caspase 3/7-Aktivität dagegen dosiabhängig gehemmt (Abb. 21). Dabei war die Caspase 3/7-Aktivität in Gegenwart von 10 μ l *E. coli*-Überstand bzw. resuspendiertem *E. coli*-Pellet im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant niedriger ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$; Student's t-Test). Nach Inkubation von Jurkat-Lysat mit Überstand und Pellet des Ultraschall-behandelten Lysates aus den NTPase-negativen *E. coli* war diese Hemmung deutlich niedriger (Abb. 21). Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme, dass die NTPase aus *T. gondii* einen vielversprechenden Kandidaten für den anti-apoptischen Effekt des Parasiten darstellt.

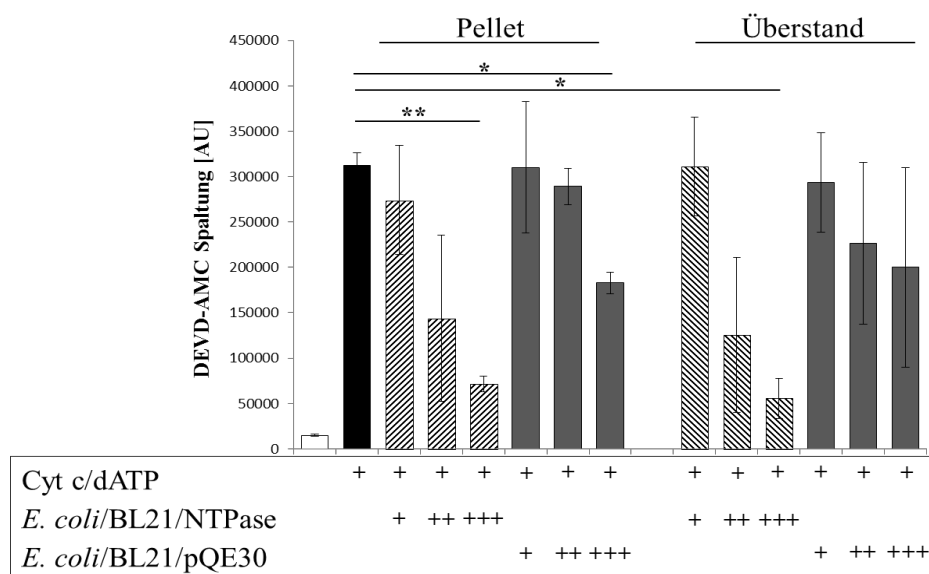


Abb. 21: Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch Rohextrakte von NTPase-exprimierenden *E. coli* Zellen von NTPase-exprimierenden *E. coli*/BL21/NTPase und von der Negativkontrolle *E. coli*/BL21/pQE30 wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. In Jurkat-Zelllysats inkubierten jeweils 1 µl (+), 5 µl (++) oder 10 µl (+++) vom Überstand oder resuspendiertem Pellet. Es folgte eine Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität durch Zugabe von 10 µg/ml Cytochrom c, 250 µM DTT und 250 µM dATP. Die Caspase 3/7-Aktivität der verschiedenen Proben wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten dar. Signifikante Unterschiede wurden durch Student's *t*-Test identifiziert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.5.4 Reinigung von *T. gondii* NTPase und *T. gondii* HSP70 unter denaturierenden Bedingungen

Um den Einfluss der rekombinanten Proteine NTPase und HSP70 von *T. gondii* auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System genauer zu untersuchen, mussten die Proteine aufgereinigt werden. Durch Expression eines Fusionsproteins mit einem N-terminalen His₆-Tag konnten die Proteine mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden (2.2.21). Hierzu wurde das Protokoll der Firma Qiagen herangezogen. Nitrioltriessigsäure (NTA) ist ein Komplexbildner. NTA besetzt vier der sechs Liganden-Bindestellen eines Ni-Ions, während die zwei verbleibenden Bindestellen für die Interaktion mit dem His₆-Tag unbesetzt bleiben. NTA bindet Metallionen weit stabiler als andere Komplexbildner und fixiert die Ionen auch unter harschen Bedingungen, wie zum Beispiel unter stringenten Waschbedingungen auf einer Chromatographie-Säule. Ni-NTA-Agarose besteht aus Ni-NTA, das an Sepharose®CL6B gekoppelt wurde und besitzt eine hohe Bindekapazität mit minimaler unspezifischer Bindung anderer Proteine.

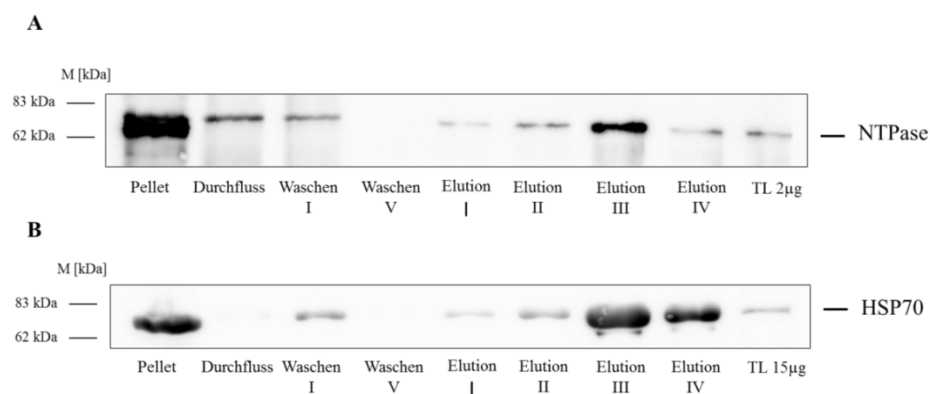


Abb. 22: Reinigung von *T. gondii* NTPase und HSP70 unter denaturierenden Bedingungen

Die Reinigung der Zellpellets von *E. coli*/BL21/NTPase und *E. coli*/BL21/HSP70 erfolgte nach Aufschluss der Zellen mit 8 M Harnstoff unter denaturierenden Bedingungen. Dazu wurden die His₆-getaggtten Fusionsproteine an Ni-NTA-Agarose auf einer Chromatographiesäule gebunden und nach mehreren Waschschritten bei abnehmenden pH-Werten eluiert. Je 10 µl der einzelnen Fraktionen von *T. gondii* NTPase (A) und HSP70 (B) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Zum quantitativen Vergleich wurden 2 µg (A) bzw. 15 µg (B) eines *T. gondii*-Lysates aufgetragen. Es folgte eine Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen die NTPase und HSP70 von *T. gondii* und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern.

Zur Reinigung von *T. gondii* NTPase und HSP70 wurden die aus den Expressionskulturen gewonnenen Zellpellets *E. coli*/BL21/NTPase und *E. coli*/BL21/HSP70 laut Herstellerprotokoll mit 8 M Harnstoff unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen (2.2.21). Das Lysat wurde an Ni-NTA-Agarose gebunden und in eine Reinigungssäule überführt. Nach mehrfachen Waschschritten wurden die Proteine bei abnehmenden pH-Werten eluiert. Alle Fraktionen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE (2.2.7) und anschließendem Western Blot (2.2.9) analysiert.

Nach Färbung mit einem spezifischen anti-*T. gondii* NTPase-Antikörper konnte das Protein sehr deutlich im *E. coli*-Zellpellet nachgewiesen werden. Nach Bindung an Ni-NTA-Agarose und mehreren Waschschritten war das Protein in allen Elutionsfraktionen nachweisbar, wobei in Elutionsfraktion III bei weitem der größte Proteingehalt nachgewiesen wurde (Abb. 22). Zum Vergleich wurden auch 2 µg *Toxoplasma*-Lysat aufgetragen, da diese Konzentration eine starke Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System gezeigt hatte. Der Vergleich der in Fraktion III eluierten NTPase und dem nativen *Toxoplasma*-Protein ergab eine deutlich größere Menge der rekombinanten NTPase in der Elutionsfraktion als in 2 µg *Toxoplasma*-Lysat. Die

Elutionsfraktion III wurde daher für folgende Untersuchungen verwendet. Da die Gesamtexpression der NTPase und die Menge des gereinigten rekombinanten Proteins jedoch insgesamt gering war, konnte nach Coomassie-Färbung in *E. coli*-Pellets, Durchfluss oder Elutionsfraktionen die rekombinante NTPase nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Auch nach Färbung der Reinigungsfraktionen von *T. gondii* HSP70 mit einem spezifischen anti-HSP70-Antikörper konnte im Zellpellet von *E. coli*/BL21/HSP70 das Protein deutlich nachgewiesen werden (Abb. 22). Wie bereits für *T. gondii* NTPase dargestellt, konnte auch His₆-getaggtetes HSP70 an Ni-NTA-Agarose gebunden werden und nach mehreren Waschschritten vor allem in den Elutionsfraktionen III und IV nachgewiesen werden (Abb. 22). Diese Fraktionen wurden zusammengefasst und wurden anschließend für die folgenden Untersuchungen eingesetzt. Zum Vergleich wurden 15 µg *Toxoplasma*-Lysat aufgetrennt und parallel analysiert. Die Menge an gereinigtem rekombinantem HSP70 war in den Elutionsfraktionen III und IV deutlich höher als in 15 µg *Toxoplasma*-Lysat (Abb. 22).

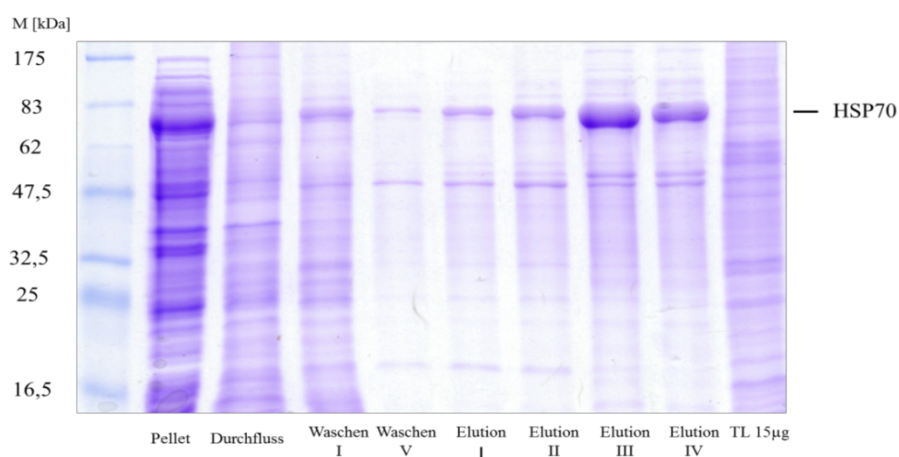


Abb. 23: Denaturierende Aufreinigung von rekombinantem *T. gondii* HSP70 nach heterologer Expression in *E. coli*

Die Reinigung der Zellpellets der Expressionskulturen *E. coli*/BL21/HSP70 erfolgte nach Aufschluss der Zellen mit 8 M Harnstoff unter denaturierenden Bedingungen. Dazu wurden das His₆-getaggtete Fusionsprotein an Ni-NTA-Agarose auf einer Chromatographiesäule gebunden und nach mehreren Waschschritten bei abnehmenden pH-Werten eluiert. Jeweils 10 µl aller Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zum quantitativen Vergleich wurde 15 µg *Toxoplasma*-Lysat mit aufgetrennt. Es folgte eine Coomassie-Blau-Färbung des Gels.

Aufgrund der starken Expression und der deutlichen Proteinmenge in den Elutionen wurde von der Reinigung des *T. gondii* HSP70 auch eine Coomassie-Färbung (2.2.8) durchgeführt. Tatsächlich konnte in den Elutionsfraktionen eine deutliche Anreicherung von rekombinantem *T. gondii* HSP70 dargestellt werden (Abb. 23).

3.5.5 Einfluss der denaturierend gereinigten rekombinanten Proteine *T. gondii* NTPase und *T. gondii* HSP70 auf die Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System

Um die rekombinanten Proteine *T. gondii* NTPase und *T. gondii* HSP70 auf die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System hin zu untersuchen, wurden die Elutionsfraktionen der Reinigungen unter denaturierenden Bedingungen im Caspase-Aktivitätstest (2.2.5) eingesetzt. Die Analysen ergaben, dass die sehr hohen Harnstoffkonzentrationen der Elutionspuffer des Reinigungssystems eine Aktivierung der Caspase-Kaskade durch Cytochrom c/dATP im zellfreien System verhinderte und somit eine Untersuchung nicht möglich machte (Daten nicht gezeigt). Die Elutionsfraktionen wurden daher zunächst mittels PD10-Säulen (2.2.22) in 30 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, pH 8,0 umgepuffert. Von den erhaltenen Proteinfractionen inkubierten anschließend 5 bzw. 10 µl in cytosolischem Jurkat-Zelllysate und die Aktivität der Caspase 3/7 wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung von Caspase 3/7-spezifischem DEVD-AMC analysiert. Die Induktion der Caspase 3/7-Aktivität erfolgte durch Zugabe von Cytochrom c und dATP, was zu einer starken Caspase-Aktivität führte (Abb. 24). Die Analysen von rekombinantem *T. gondii* HSP70 nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen zeigten nach Zugabe der unterschiedlichen Mengen der Elutionsfraktionen keinen inhibierenden Effekt auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System (Abb. 24A). Im Vergleich zu den äquivalenten Mengen der Elutionsfraktionen aus der Reinigung der Kontrollelexpression *E. coli*/BL21/pQE30 wurde in allen Ansätzen eine unveränderte Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität festgestellt. Dies zeigte, dass denaturierend aufgereinigtes, bakteriell exprimiertes HSP70 von *T. gondii* die Cytochrom c-vermittelte Caspase-Aktivierung nicht verminderte und deutete darauf hin, dass es keine Rolle bei der Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch den Parasiten spielt.

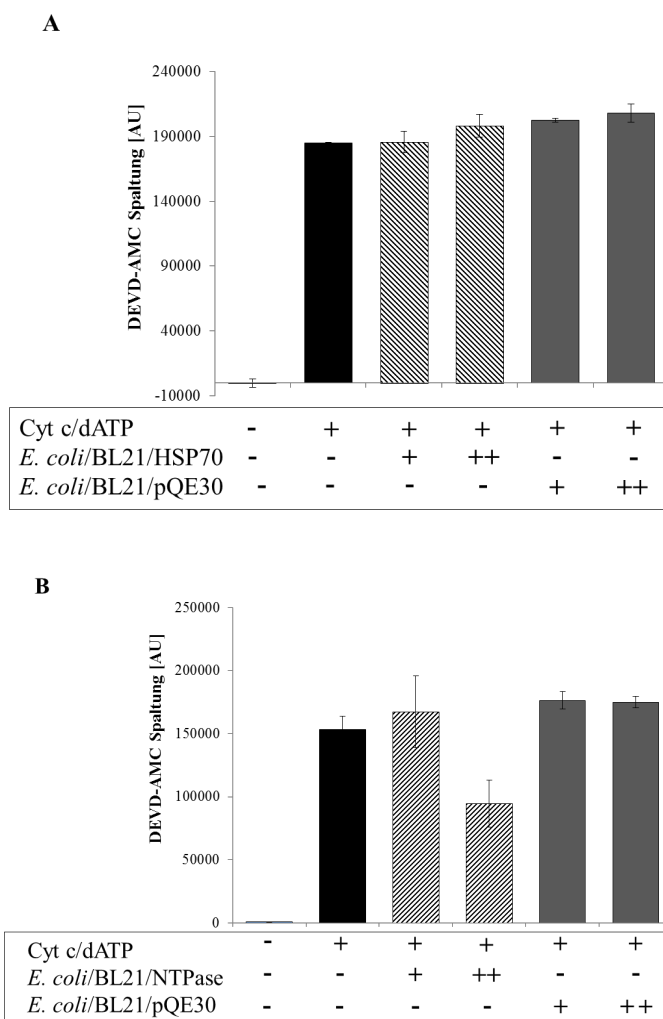


Abb. 24: Einfluss von bakteriell exprimiertem *T. gondii* HSP70 und *T. gondii* NTPase nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen auf die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase 3/7

Cytosolischer Jurkat-Zellextrakt inkubiert mit 5 (+) bzw. 10 μ l (++) der in 30 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, pH 8,0 umgepufferten Proteinfraktionen von HSP70 (A) und NTPase (B) aus der Reinigung unter denaturierenden Bedingungen. Es folgte eine Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität durch Zugabe von 10 μ g/ml Cytochrom c, 250 μ M DTT und 250 μ M dATP. Die Caspase 3/7-Aktivität der verschiedenen Proben wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten dar.

Um den Einfluss von rekombinanter *T. gondii* NTPase nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen im zellfreien System zu analysieren, inkubierten auch jeweils 5 bzw. 10 μ l der mittels PD10-Säulen umgepufferten Elutionsfraktionen in cytosolischem Jurkat-Zelllysat. Durch Zugabe von Cytochrom c und dATP erfolgte die Aktivierung der Caspase-Kaskade. Die Zugabe von 5 μ l der Elutionsfraktion der bakteriell exprimierten *T. gondii* NTPase zeigte keinen Effekt auf die Caspase-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Allerdings war die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-

Aktivität in Gegenwart von 10 µl der Elutionsfraktion der unter denaturierenden Bedingungen gereinigten NTPase von *T. gondii* deutlich niedriger im Vergleich zur Elutionsfraktion der NTPase-negativen Kontrolle (Abb. 24B). Diese Ergebnisse unterstützten weiterhin die Annahme, dass die NTPase von *T. gondii* ein vielversprechender Kandidat für den anti-apoptotischen Effekt des Parasiten darstellt.

3.5.6 Reinigung von *T. gondii* HSP70 und NTPase unter nativen Bedingungen

Aufgrund der Tatsache, dass rekombinantes *T. gondii* HSP70 nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen keinen Einfluss auf die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität hat und rekombinante *T. gondii* NTPase nur einen relativ niedrigen Einfluss besaß, erfolgte auch eine native Reinigung der rekombinanten His₆-Tag-Fusionsproteine *T. gondii* NTPase und *T. gondii* HSP70. Dies wurde mit steigender Imidazolkonzentration laut Herstellerprotokoll (Qiagen) durchgeführt. Da bei einer Reinigung unter nativen Bedingungen die Gefahr einer Bindung unspezifischer Proteine wesentlich größer ist als im Vergleich zur Reinigung unter denaturierenden Bedingungen, wurden dem Lyse- und Waschpuffer eine geringe Konzentration von 10 bzw. 40 mM Imidazol zugefügt. Der Imidazol-Ring ist Bestandteil des Histidins im His₆-Tag. Es bindet an Ni-Ionen und vermindert dadurch die Bindung von Histidinresten nicht-getaggtter Proteine. Die Zellpellets der Expressionskulturen *E. coli*/BL21/NTPase und *E. coli*/BL21/HSP70 wurden mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und lösliche Proteine an Ni-NTA-Agarose gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurden die gebundenen Proteine in mehreren Schritten durch eine hohe Imidazolkonzentration von 250 mM eluiert. Alle Fraktionen der Reinigungen wurden mittels SDS-PAGE (2.2.7) und anschließendem Western Blot (2.2.9) analysiert. Nach Färbung mit den spezifischen Antikörpern anti-*T. gondii* NTPase und anti-*T. gondii* HSP70 konnte in den Zellpellets von *E. coli*/BL21/NTPase und *E. coli*/BL21/HSP70 nach Induktion der Expression NTPase und HSP70 deutlich nachgewiesen werden (Abb. 25A, B).

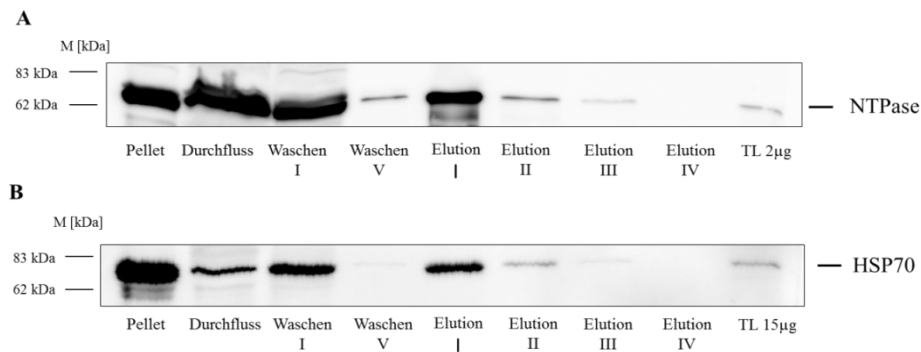


Abb. 25: Reinigung von *T. gondii* NTPase und HSP70 unter nativen Bedingungen

Die Reinigung der Zellpellets *E. coli*/BL21/NTPase und *E. coli*/BL21/HSP70 erfolgte nach Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbehandlung unter nativen Bedingungen. Dazu wurden die His₆-getaggten Fusionsproteine an Ni-NTA-Agarose auf einer Chromatographiesäule gebunden und nach mehreren Waschschritten mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM eluiert. Je 10 µl der einzelnen Fraktionen von *T. gondii* NTPase (A) und HSP70 (B) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Zum quantitativen Vergleich wurden 2 µg (A) bzw. 15 µg (B) eines *T. gondii*-Lysates aufgetragen. Es folgte eine Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen die NTPase und HSP70 von *T. gondii* und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern.

Während der Aufreinigung beider Proteine wurde sowohl in den Durchflussfraktionen, als auch durch Waschen der Säule ein Teil der rekombinanten Proteine verloren. Dennoch konnte jeweils in den ersten Elutionsfraktionen deutliche Proteinmengen an rekombinanter NTPase und HSP70 isoliert werden (Abb. 25A, B). Zum quantitativen Vergleich der Proteinmengen wurden im Falle der NTPase wiederum 2 µg und im Falle von HSP70 15 µg *Toxoplasma*-Lysat parallel aufgetrennt und analysiert. Dabei enthielten die Elutionsfraktion I bei der Reinigung unter nativen Bedingungen jeweils deutlich größere Mengen an rekombinanter *T. gondii* NTPase bzw. *T. gondii* HSP70 als in 2 µg bzw. 15 µg *T. gondii*-Lysat vorhanden waren. Die Elutionsfraktionen I der Reinigungen wurden daher anschließend für weitere Untersuchungen verwendet. Aufgrund der stark unterschiedlichen Expressionsstärken der Proteine konnte ausschließlich von der Reinigung von *T. gondii* HSP70 nach Coomassie-Färbung (2.2.8) eines SDS-Gels das Protein nachgewiesen werden (2.2.7). Dabei war eine deutliche Anreicherung von HSP70 in den Elutionsfraktionen, vor allem in Elutionsfraktion I festzustellen (Abb. 26).

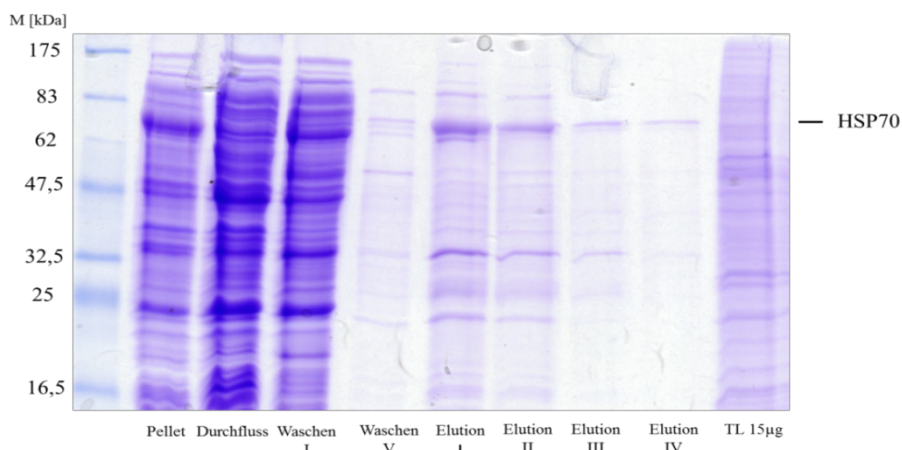


Abb. 26: Native Aufreinigung von rekombinantem *T. gondii* HSP70 nach heterologer Expression in *E. coli*

Die Reinigung der Zellpellets der Expressionskulturen von *E. coli*/BL21/HSP70 erfolgte nach Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbehandlung unter nativen Bedingungen. Dazu wurden die His₆-getaggtten Fusionsproteine an Ni-NTA-Agarose auf einer Chromatographiesäule gebunden und nach mehreren Waschschritten mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM eluiert. Jeweils 10 µl aller Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zum quantitativen Vergleich wurden 15 µg *Toxoplasma*-Lysat parallel aufgetrennt und analysiert. Es folgte eine Coomassie-Blau-Färbung des Gels.

3.5.7 Einfluss der rekombinanten Proteine *T. gondii* NTPase und *T. gondii* HSP70 nach Reinigung unter nativen Bedingungen auf die Caspase 3/7-Aktivierung im zellfreien System

Nach einer Reinigung unter nativen Bedingungen sollten die rekombinanten Proteine *T. gondii* NTPase und *T. gondii* HSP70 ebenfalls auf die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System hin untersucht werden. Die Auswertungen ergaben auch nach der nativen Reinigung, dass die hohen Salzkonzentrationen der Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eine Aktivierung der Caspase-Kaskade durch Cytochrom c und dATP im zellfreien System störten und somit eine weitere Untersuchung nicht möglich machten (Daten nicht gezeigt). Die Elutionsfraktionen wurden darum zunächst mittels PD10-Säulen (2.2.22) entsalzt und in 30 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, pH 8,0 umgepuffert. Es inkubierten anschließend 5 bzw. 10 µl der erhaltenen Proteinfractionen in cytosolischem Jurkat-Zelllysat und die Aktivität der Caspase 3/7 wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung von Caspase

3/7-spezifischem DEVD-AMC analysiert. Durch Zugabe von Cytochrom c und dATP erfolgte eine deutliche Induktion der Caspase 3/7-Aktivität (Abb. 27A, B).

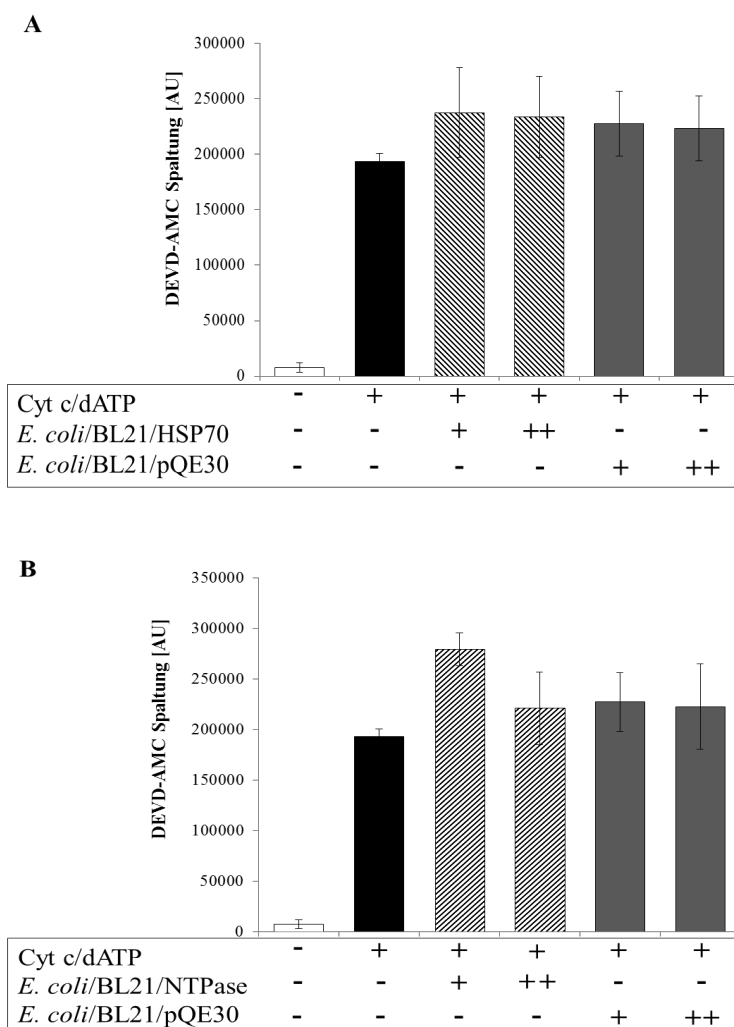


Abb. 27: Einfluss von bakteriell exprimiertem HSP70 und NTPase von *T. gondii* nach Reinigung unter nativen Bedingungen auf die Aktivierung der Caspase 3/7 durch Cytochrom c im zellfreien System

Cytosolische Jurkat-Zell-extrakt inkubiert mit 5 (+) bzw. 10 µl (++) der in 30 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0 umgepufferten Proteinfractionen von HSP70 (A) und NTPase (B) aus der Reinigung unter nativen Bedingungen. Es folgte eine Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität durch Zugabe von 10 µg/ml Cytochrom c, 250 µM DTT und 250 µM dATP. Die Caspase 3/7-Aktivität der verschiedenen Proben wurde durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten dar.

Die Analysen von rekombinantem *T. gondii* HSP70 nach Reinigungen unter nativen Bedingungen zeigten keinen inhibierenden Effekt auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System im Vergleich zu den getesteten Negativkontrollen (Abb. 27A). Dies bestätigte die Untersuchungen von rekombinantem *T. gondii* HSP70 nach

Reinigung unter denaturierenden Bedingungen im Hinblick auf die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Aktivität im zellfreien System. Die Ergebnisse zeigten zusammenfassend, dass bakteriell exprimiertes HSP70 von *T. gondii* die Cytochrom c-vermittelte Caspase-Aktivierung nicht hemmt und deutet darauf hin, dass es kein anti-apoptisches Effektormolekül des Parasiten darstellt.

Um den Effekt bakteriell exprimierter *T. gondii* NTPase nach Reinigung unter nativen Bedingungen auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität zu untersuchen, inkubierten 5 bzw. 10 µl der entsalzten Proteinfractionen in cytosolischen Jurkat-Zelllysat. Es konnte eine starke Cytochrom c-induzierte Aktivität der Caspase 3/7 erreicht werden (Abb. 27B). Nach Zugabe der entsalzten Proteinfractionen zeigte sich keine Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System im Vergleich zur Negativkontrolle. Dies ließ den Schluss zu, dass die bakteriell exprimierte NTPase nach Reinigung unter nativen Bedingungen keinen Einfluss auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität hatte.

3.5.8 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System durch funktionell aktive NTPase von *T. gondii*

Da bei den Expressionsversuchen und während der Reinigung nur geringe Mengen der NTPase gewonnen werden konnte, wurden in Zusammenarbeit mit T. Asai, Tokyo weitere Untersuchungen mit rekombinanter NTPase ohne His₆-Tag und in funktionell aktiver Form durchgeführt. Das *NTPase I*-Gen aus dem *T. gondii*/RH-Stamm wurde in den pET-11d Vektor integriert und die Expression der *T. gondii* NTPase erfolgte in *E. coli*/BL21 Zellen nach Zugabe von 0,2 mM IPTG für 2,5 h. Die Zellen wurden unter nativen Bedingungen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Einschlusskörperchen (inclusion bodies), die das exprimierte Protein enthielten, wurden mit 8 M Harnstoff aufgeschlossen und es folgte eine Rückfaltung des Proteins mittels reduziertem und oxidiertem Glutathion. Anschließend wurde die rekombinante NTPase gereinigt und entsalzt.

Die NTPase wurde im zellfreien System im Hinblick auf eine mögliche Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität untersucht. Hierzu inkubierte das rekombinante Protein in Konzentrationen von 1, 0,5, 0,2, 0,1 und 0,05 µg in cytosolischem

Jurkat-Zelllysate. Zum Vergleich inkubierten auch 2, 1, 0,5 und 0,2 μg *Toxoplasma*-Lysat im cytosolischen Jurkat-Zelllysate. Die Induktion der Caspase 3/7-Aktivität erfolgte durch Zugabe von Cytochrom c und dATP. Die Auswertung der fluorimetrischen Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC ergab eine dosisabhängige Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch das rekombinante Protein (Abb. 28). Im Vergleich zum *Toxoplasma*-Lysat zeigte die rekombinante NTPase schon bei dem Einsatz von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ im cytosolischen Jurkat-Zelllysate eine hoch signifikante Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität. Nach Zugabe von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des rekombinanten Proteins ergab sich noch eine signifikante Inhibierung der Caspase-Aktivität, wobei 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Toxoplasma*-Lysat keine nennenswerte Hemmung aufwies.

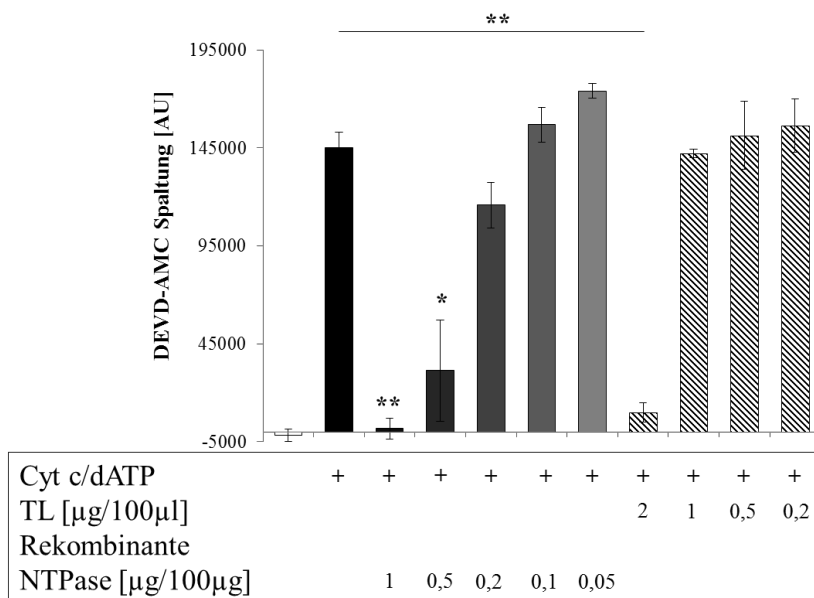


Abb. 28: Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch bakteriell exprimierte, funktionell aktive *T. gondii* NTPase im zellfreien System

Es inkubierten 1, 0,5, 0,2, 0,1 und 0,05 μg der rekombinanten *T. gondii* NTPase und 2, 1, 0,5 und 0,2 μg *Toxoplasma*-Lysat in cytosolischem Jurkat-Zelllysate. Die Caspase 3/7-Aktivität wurde durch Zugabe von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cytochrom c, 250 μM DTT und 250 μM dATP induziert. Anschließend wurde die Caspase 3/7-Aktivität der verschiedenen Proben durch fluorimetrische Messung der Spaltung des Caspase 3/7-spezifischen Substrates DEVD-AMC gemessen. Die Balken stellen Mittelwerte \pm SEM für drei unabhängige Experimente dar. Signifikante Unterschiede wurden durch Student's *t*-Test identifiziert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Um einen genaueren Vergleich der Hemmung durch das rekombinante Protein und der Hemmung durch *Toxoplasma*-Lysat ziehen zu können, wurden die im zellfreien System untersuchten Konzentrationen der rekombinanten NTPase und des *Toxoplasma*-Lysates

mittels SDS-PAGE (2.2.7) und Western Blot (2.2.9) analysiert. Nach Färbung mit einem spezifischen anti-NTPase-Antikörper zeigten sich deutliche und dosisabhängige Proteinlevel der NTPase bei allen Konzentrationen von *Toxoplasma*-Lysat und rekombinater NTPase (Abb. 29). Ein quantitativer Mengenvergleich von rekombinanter NTPase und der NTPase im *Toxoplasma*-Gesamtlysate in der Western Blot-Analyse zeigte, dass 0,1 µg der rekombinanten NTPase etwa so viel von dem Protein enthielt, wie in 2 µg *Toxoplasma*-Lysat vorhanden war. 10 µg *Toxoplasma*-Lysat enthielt mengenmäßig etwa gleich viel NTPase wie in 0,2-0,5 µg des gereinigten rekombinanten Proteins (Abb. 29). Vergleicht man diese Untersuchungen mit der Hemmung der Caspase-Aktivität im zellfreien System, so wurde gezeigt, dass das rekombinante und gereinigte Protein die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität nicht so stark hemmte, wie endogene NTPase aus dem *Toxoplasma*-Lysat. Allerdings ist eine hoch signifikante Hemmung des rekombinanten Proteins bei Einsatz von 1 µg deutlich herausgestellt worden. Dies bestätigte, dass die NTPase von *T. gondii* die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität vermittelte und ein anti-apoptisches Effektormolekül von *T. gondii* darstellt.

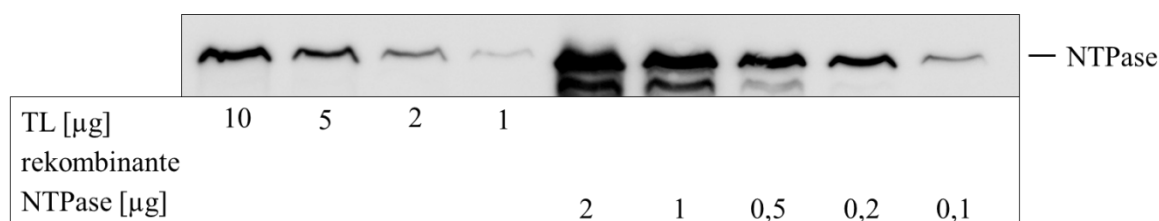


Abb. 29: Mengenvergleich der *T. gondii* NTPase in *Toxoplasma*-Gesamtlysate und nach bakterieller Expression

Unterschiedliche Mengen von 0,1, 0,2, 0,5, 1 und 2 µg der NTPase und *Toxoplasma*-Lysate in den Mengen 1, 2, 5 und 10 µg wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anschließenden Western Blot analysiert. Es folgte eine Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen NTPase von *T. gondii* und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper.

3.6 Einfluss der *T. gondii* NTPase auf die Wirtszellapoptose in menschlichen Jurkat und HeLa Zellen

Um den Einfluss der *T. gondii* NTPase in eukaryotischen Zellen weiter zu untersuchen, sollte das Protein in menschlichen Jurkat-oder HeLa-Zellen heterolog exprimiert werden. Dabei wurde das Proteo Tuner Expressionssystem angewendet. Der pPTuner ist ein Expressionsvektor, der die präzise Regulation der Menge des zu untersuchenden Proteins in Säugerzellen und somit die direkte Untersuchung der Funktion eines Proteins ermöglichen soll. Das System basiert auf einer 12 kDa Destabilisierungsdomäne, welche als Fusionsdomäne am zu untersuchenden Protein exprimiert wird und den Verdau des Proteins durch das Proteasom vermittelt (Banaszynski et al., 2006). Durch Zugabe eines 750 Dalton großen, Membran-permeablen Stabilisierungsliganden, dem sogenannten Shield1, wird die Destabilisierungsdomäne inaktiviert, so dass das Protein exprimiert wird und sich in der Zelle anreichert. Die Menge des akkumulierenden Proteins ist proportional zur Menge an zugegebenen Shield1.

Das *NTPase*-Gen aus *T. gondii* konnte erfolgreich in den pPTuner Expressionsvektor integriert werden. Zur Kontrolle wurde die richtige Integration des Gens in den Vektor mittels Sequenzierung (Firma Seqlab, Göttingen) bestätigt. Eine Transfektion von Jurkat und HeLa Zellen mit dem pPTuner Vektor als Negativkontrolle und dem pPTuner/NTPase wurde mittels FuGene® HD Transfektionsreagenz durchgeführt. Die erfolgreiche Transfektion der Zellen wurde durch Nachweis der integrierten DNA des Vektors, sowie durch Nachweis der mRNA anhand von PCR-Analysen bestätigt (Abb. 30).

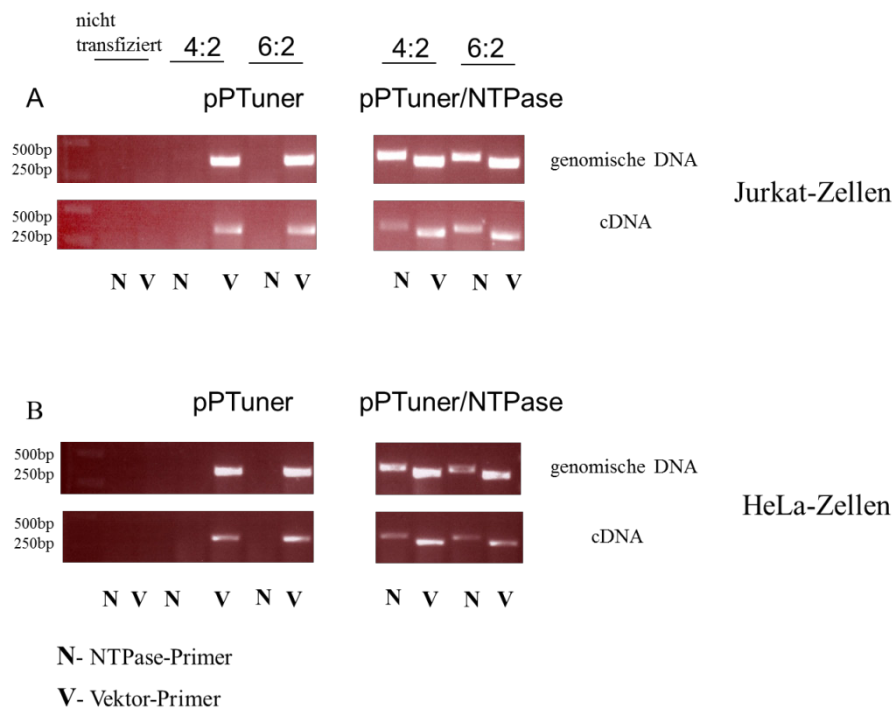


Abb. 30: PCR-Analyse der Jurkat/pPTuner/NTPase und HeLa/pPTuner/NTPase

Nach Einbringen des Plasmids pPTuner Vektor/NTPase und der Negativkontrolle pPTuner in die Jurkat- (A) und HeLa-Zellen (B) wurde aus diesen Zellen genomische DNA oder Gesamt-RNA gewonnen. Nach Isolierung von Gesamt-RNA und DNase-Verdau wurde aus mRNA cDNA synthetisiert. Mit spezifischen Primern, die das Gen *NTPase* amplifizieren (NTPase-Primer) und Primern, die die Vektorsequenz amplifizierten (Vektor-Primer) wurde die genomische DNA und die cDNA der transfizierten Jurkat- (A) und HeLa-Zellen (B) auf die korrekte Integration des Gens für die NTPase und des leeren Vektors mittels PCR hin überprüft. Hierzu wurden jeweils die rekombinanten Jurkat- und HeLa-Zellen der Transfektionsansätze 4:2 und 6:2 (Transfektionsreagenz [μ l]: DNA [μ g]) untersucht. Nach Agarosegelelektrophorese konnten Genfragmente der richtigen Größe detektiert werden.

Mit den anschließenden Expressionsversuchen sollte gezeigt werden, ob eine Expression der NTPase aus *T. gondii* in Säugerzellen einen Einfluss auf die Apoptoseregulation hat. Hierzu wurden die transfizierten Jurkat und HeLa Zellen mit und ohne Shield1 in einer Konzentration von 1 μ M behandelt. Nach 3 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und Gesamtproteinextrakt (2.2.4.3) hergestellt. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE (2.2.7) und Western Blot (2.2.9) analysiert. Es folgte eine Färbung mit spezifischen anti-*T. gondii* NTPase-Antikörper. Als Positivkontrolle für die Expression der NTPase wurden 2 μ g *Toxoplasma*-Lysat parallel aufgetragen. Nach Shield1-Behandlung konnte jedoch keine Expression der *T. gondii* NTPase in HeLa Zellen nachgewiesen werden (Abb. 31). Auch nach Einsatz von Shield1 in unterschiedlichen Konzentrationen von 50 nM bis 1 mM

und unterschiedlichen Inkubationszeiten konnte die *T. gondii* NTPase nicht in nachweisbarer Konzentration in rekombinanten Jurkat- oder HeLa-Zellen detektiert werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Somit war dieser Untersuchungsansatz nicht geeignet, um den Einfluss einer heterologen Expression der *T. gondii* NTPase auf die Wirtszellapoptose in eukaryotischen Zellen weiter zu untersuchen.

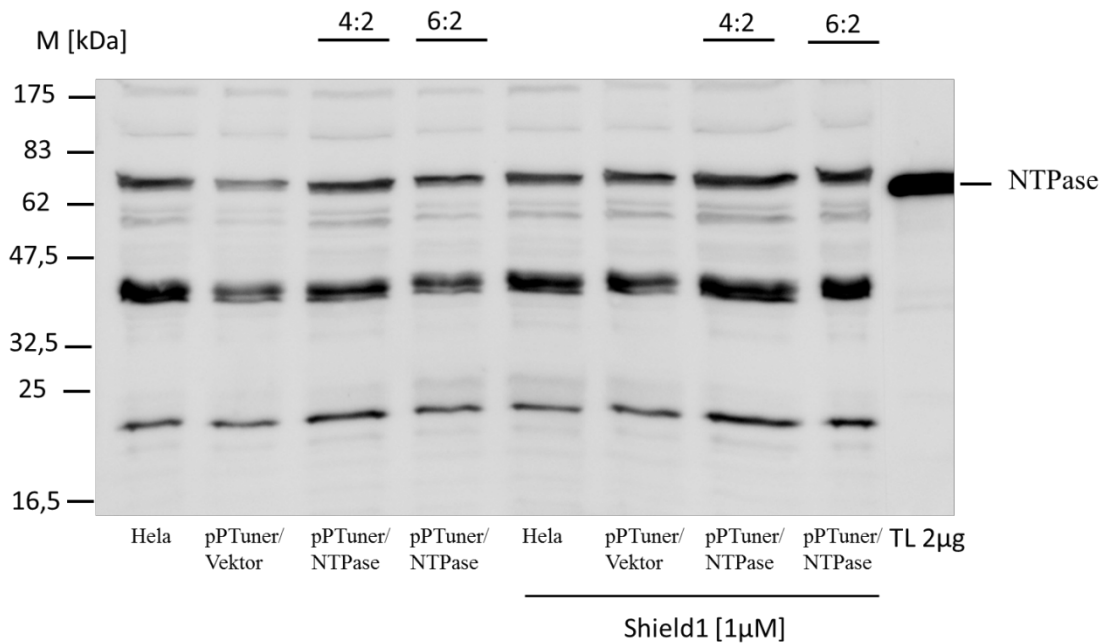


Abb. 31: Western Blot-Analyse der *T. gondii* NTPase-Expression nach Shield1-Behandlung von rekombinanten HeLa-Zellen

Mit dem pPTuner Vektor/NTPase und pPTuner Vektor transfizierte HeLa-Zellen in den Ansätzen 4:2 und 6:2 (Transfektionsreagenz [μl]: DNA [μg]) sowie nicht-transfizierte HeLa-Zellen wurden mit und ohne 1 μM Shield1 behandelt. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot-Analyse und NTPase-spezifischer Antikörperfärbung untersucht. Zum Vergleich wurden 2 μg *Toxoplasma*-Lysat (TL) parallel aufgetragen und analysiert.

4. Diskussion

4.1 Interaktion von *Toxoplasma gondii* mit der Wirtszellapoptose

Der intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* hat vielfältige Strategien entwickelt, die ihm ein Überleben und die Vermehrung in der Wirtszelle ermöglichen. Hierzu zählt unter anderem die Hemmung der Wirtszellapoptose (Graumann et al., 2009). Der Parasit ist in der Lage, die Apoptose nach Behandlung mit unterschiedlichen proapoptotischen Stimuli zu inhibieren (Nash et al., 1998; Goebel et al., 2001). *T. gondii* beeinflusst hierbei auf unterschiedliche Weise Signalkaskaden der Wirtszelle. So konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* die Aktivierung der Caspase-Kaskade manipuliert, unter anderem indem die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytoplasma der Wirtszelle erfolgreich gehemmt wird (Goebel et al., 2001; Hippe et al., 2009). Dies führt zur Hemmung der Caspase 3 und der oberhalb befindlichen Caspase 9. Weiterhin kommt es durch eine Degradierung von Caspase 8 in *T. gondii*-infizierten Zellen zur Inhibierung der Fas/CD95-vermittelten Apoptose (Vutova et al., 2007). Unterhalb der Mitochondrien konnte in einem zellfreien in vitro-System eine Hemmung der Cytochrom c-induzierten Aktivierung der Caspase 3/7 gezeigt werden, was eine direkte Interaktion des Parasiten mit den Komponenten der Caspase-Kaskade der Wirtszelle vermuten lässt (Keller et al., 2006). Auch Zellkulturüberstände von extrazellulären Parasiten konnten die Caspase-Aktivität inhibieren, was verdeutlicht, dass Moleküle der exkretorisch-sekretorischen Organellen des Parasiten direkt mit der Caspase-Kaskade interferieren (Keller et al., 2006). Für diese Untersuchungen wurde ein zellfreies System genutzt, bestehend aus cytosolischem Jurkat-Zelllysat in dem keine intakten Zellorganellen vorliegen und in dem der mitochondrial vermittelte Apoptosesignalweg durch Zugabe von Cytochrom c und dATP induziert werden kann. Eine Hemmung der Caspase-Aktivität findet in diesem System unabhängig von einer modifizierten Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und einer veränderten Genexpression statt (Keller et al., 2006). Außerdem haben dem System von außen zugegebene Moleküle direkten Kontakt mit den Komponenten der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung. Somit kann dieses zellfreie System zur Untersuchung von direkten Interaktionen von intrazellulären Parasiten, wie z.B. *T. gondii*, mit den Signalwegen der Wirtszelle herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Aktivierung der Caspase 3

auch in *T. gondii*-infizierten Zellen eine Rolle spielt. Untersuchungen zur Apoptosombildung zeigten, dass der Parasit schon auf Ebene der Caspase 9-Rekrutierung eingreift und direkt mit der Zusammenlagerung von APAF-1 und Caspase 9 interferiert. Auch konnte gezeigt werden, dass sogar ein schon gebildetes Apoptosom durch Anwesenheit des Parasiten offensichtlich wieder dissoziiert. Weiterhin konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass die NTPase von *T.gondii* eine tragende Rolle bei der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung spielt und somit ein anti-apoptotisches Molekül des Parasiten darstellt.

4.2 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *Toxoplasma gondii* in infizierten Zellen

Dass *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität *in vitro* in einem zellfreien System dosisabhängig hemmt, ist bekannt (Keller et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass in *T. gondii*-infizierten Zellen ebenfalls eine Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität erfolgt. In Caspase 9-defizienten (JMR) Zellen, in denen die Caspase 9 ausgeschaltet ist, und in Caspase 9-retransfizierten (F9) Zellen wurde die Wirtszellapoptose durch Staurosporin induziert. Staurosporin ist ein Inhibitor der Klasse der Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Proteinkinasen und löst in allen kernhaltigen Zellen die Apoptose aus (Akarid et al., 2004). Um die direkte Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität unterhalb der Mitochondrien, unabhängig der Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung in diesen Zellen zu untersuchen, wurden JMR und F9-Zellen mit vergleichbarer Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung untersucht. Hier konnte nach Infektion mit dem Parasiten in den Caspase 9-retransfizierten (F9) Zellen eine um etwa 30% stärkere Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität nachgewiesen werden, als in Caspase 9-defizienten Zellen. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass in diesem System die Apoptose um etwa 30% auf der Ebene der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien, also vermutlich durch Modulation der Bcl-2-Proteine (Hippe et al., 2009) erfolgte, während weitere 30% auf eine Hemmung der Cytochrom c-vermittelten Aktivierung der Caspase-Kaskade zurückzuführen waren. Damit scheint die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung einen ähnlichen

Stellenwert bei der Apoptosehemmung zu besitzen, wie die Modulation der Apoptose oberhalb der Mitochondrien.

In einem anderen Untersuchungssystem konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Parasit die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivierung auch in infizierten Zellen hemmt. Hier wurde das System der Elektroporation von Jurkat-Zellen in Medium mit und ohne Cytochrom c eingesetzt, da die Apoptosehemmung durch *T. gondii* dabei ebenfalls unabhängig von einer verminderten Cytochrom c-Freisetzung erfolgt. Ziel war es hier, in infizierten Zellen hinsichtlich der cytoplasmatischen Cytochrom c-Konzentration und der Parasitenmenge dem zellfreien System vergleichbare Bedingungen zu schaffen (Keller et al., 2006). Es zeigte sich in den mit *T. gondii* infizierten Zellen nach Elektroporation mit Cytochrom c eine vollständige Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass der Parasit die Menge an cytosolischem Cytochrom c im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen veränderte. Diese Hemmung erfolgte also unabhängig einer verminderten Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Es ist also gezeigt worden, dass in diesem Untersuchungssystem eine höhere Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität in infizierten Zellen durch den Parasiten stattfindet, als in Caspase 9-retransfizierten Zellen. Vergleichend bestand allerdings aufgrund der Versuchsbedingungen die Erwartung, dass in den infizierten Caspase 9-retransfizierten Zellen und den Jurkat-Zellen, in denen Cytochrom c artifiziell erhöht wurde, eine vergleichbare Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität stattfindet. Diese Diskrepanz in der Höhe der Hemmung kann zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich nur durch die relativ hohen Variabilitäten der einzelnen Versuchsansätze erklärt werden. Die Tatsache, dass der Parasit die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität in infizierten Zellen hemmt, konnte in einem anderen Versuchsansatz weiter bestätigt werden. Dazu wurden Jurkat-Zellen mit verschiedenen Mengen an Parasiten infiziert. Nach Herstellung eines Proteinlysates dieser Zellen konnte eine dosisabhängige Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität gezeigt werden. Hier konnte nach Infektion der Jurkat-Zellen von 30 Parasiten pro Wirtszelle eine Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität von 70% nachgewiesen werden. Dies stimmt in der Größenordnung mit den oben genannten Untersuchungen überein. Zusammenfassend ist also gezeigt worden, dass die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii* auch in infizierten Zellen eine wichtige Rolle bei der Apoptosehemmung spielt. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens ein Drittel der Hemmung der Wirtszellapoptose durch den Parasiten auf den Einfluss von *T.*

gondii auf die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität in infizierten Zellen zurückzuführen ist. Dies bestätigt die Annahme, dass der Parasit mitochondrial vermittelte die Wirtszellapoptose durch unterschiedliche Mechanismen hemmen kann und auf unterschiedlichen Ebenen in der Zelle mit der Apoptosesignalkaskade der Wirtszelle interagiert.

Es sind bisher verschiedene Mechanismen beschrieben worden, wie *T. gondii* den intrinsischen Apoptosesignalweg der Wirtszelle hemmt. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass *T. gondii* die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien erfolgreich hemmt (Goebel et al., 2001). Dies trägt in infizierten Zellen zur Hemmung der Caspase 3-Aktivierung bei, wie auch zur Hemmung der oberhalb befindlichen Caspasen 8 und 9 (Goebel et al., 2001; Payne et al., 2003). Die verminderte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien dürfte u.a. durch erhöhte Level an anti-apoptischen Proteinen der Bcl-2 Familie, wie z. B. Mcl und A1, (Goebel et al., 2001; Orlofsky et al., 2002; Molestina et al., 2003) und eine Blockade der proapoptischen Proteine Bax und Bak (Hippe et al., 2009) reguliert sein. Hierbei verhindert der Parasit in infizierten Zellen die Translokation von Bax an die Mitochondrien und die darauf folgende Oligomerisierung in der Mitochondrienmembran und somit die Freisetzung von Cytochrom c. In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass der Parasit in infizierten Zellen die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität hemmt. Eine direkte Aktivierung der Caspase 3 wurde bisher für *Entamoeba histolytica* beschrieben (Huston et al., 2000).

4.3 Hemmung der Bindung von Procaspase 9 an APAF-1 durch *T.gondii*

Für einige intrazelluläre Erreger ist beschrieben worden, dass Proteine, wie beispielsweise CrmA von Pockenviren oder p35 von Baculoviren, die Caspase 3 direkt hemmen können (Hasnain et al., 2003). *T. gondii* Tachyzoiten sind hingegen nicht in der Lage die Caspase 3 direkt zu hemmen. Dies wurde in Untersuchungen mit Granzym B gezeigt, welches die Caspase 3 direkt aktiviert (Adrain et al., 2005). Im Gegensatz zur Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität war die Granzym B-induzierte Caspase 3/7-Aktivität in einem zellfreien System nach Infektion mit *T. gondii* nicht gehemmt (Keller et al., 2006). Granzym B wird von natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten

freigesetzt und spaltet genau wie die Caspasen seine Substrate an Aspartat-Resten. Es konnte auch gezeigt werden, dass *T. gondii*-Tachyzoiten die Aktivität der Caspase 9 hemmt (Schaumburg, 2007). Durch die Anlagerung an das Apoptosom und Dimerisierung entwickelt die unprozessierte Caspase 9 ihre katalytische Aktivität (Riedl and Shi, 2004; Riedl and Salvesen, 2007). Die Spaltung von Caspase 9 wird auch als Hemmmechanismus angesehen, da der endogene Inhibitor von Caspase 9, XIAP, nur die prozessierte Caspase 9 inhibieren kann (Srinivasula et al., 2001; Riedl and Shi, 2004). Aufgrund der oben erwähnten Hemmung der Caspase 9 durch *T. gondii* musste das Eingreifen des Parasiten in die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität daher auf einer frühen Stufe des mitochondrial-vermittelten Apoptosesignalweges stattfinden. Zur weiteren Untersuchung dieser Hemmung wurde in dieser Arbeit die Anlagerung von Procaspase 9 an APAF-1 in Gegenwart des Parasiten analysiert. Mittels Immunkopräzipitation konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* die Zusammenlagerung von APAF-1 und Procaspase 9 hemmte und somit ein wesentlicher Schritt zur Aktivierung der Caspase 9 (Riedl and Shi, 2004) gestört ist. Dies bestätigte frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Schaumburg, 2007). Es ist jedoch immer noch unklar, ob *T. gondii* die Bindung von Procaspase 9 an APAF-1 hemmt, oder ob der Parasit bereits die Oligomerisierung der APAF-1-Moleküle inhibiert. Eine mögliche Protein-Protein Interaktion könnte beispielsweise mit Hilfe des „yeast two hybrid“ Systems untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass nicht nur Tachyzoiten von *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Caspase 9-Aktivität im zellfreien System hemmen, sondern auch Gesamtlysat des Parasiten eine dosisabhängige Inhibierung der Caspase-Aktivität in Jurkat-Zelllysaten zeigt. Es wurden daraufhin mit Unterstützung der Arbeitsgruppe um Susanne Eschenburg, Hannover Untersuchungen zur Hemmung der Apoptosombildung durch Parasitenlysat durchgeführt. In einem rekonstituierten Testsystem bestehend aus rekombinantem, gereinigtem APAF-1 und Caspase 9 konnte der Einfluss des Parasitenlysates auf die Apoptosombildung untersucht werden. Die Ergebnisse bestätigten die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit, dass *T. gondii* die Zusammenlagerung des Apoptosoms verhindert und die Aktivierung der Caspase 9 dosisabhängig hemmt. Dieses Untersuchungssystem besteht nur aus den Komponenten des Apoptosoms und den Parasitenmolekülen aus dem *T. gondii*-Lysat. Es kann hier somit ausgeschlossen werden, dass andere Moleküle der Wirtszelle beispielsweise als Adaptormoleküle oder Kofaktoren an der Hemmung der Caspase-Aktivität beteiligt sind. So ist beispielsweise bekannt, dass Ca^{2+} in physiologischen Konzentrationen die Apoptosombildung hemmen.

Weiterführende Analysen zeigten sogar deutlich, dass nicht nur eine direkte Interaktion und Hemmung der Apoptosombildung stattfindet, sondern Proteine des Parasiten auch nach der Bildung des Apoptosoms die Caspase-Aktivierung hemmen können und das Apoptosom möglicherweise in Gegenwart von Parasiten-Proteinen dissoziiert. Zusammen mit den Ergebnissen der Immunpräzipitation in dieser Arbeit unterstützt dies die Annahme, dass ein Parasitenmolekül die Caspase 9-Aktivität möglicherweise durch direkte Bindung an eine Komponente des Apoptosoms hemmt. Hierbei ist es am wahrscheinlichsten, dass die Bindung an APAF-1 stattfindet. In früheren Arbeiten konnte im Zuge einer Immunkopräzipitation von APAF-1 in Gegenwart des Parasiten ein Parasitenmolekül kopräzipitiert werden (Schaumburg, 2007). Außerdem sind einige Moleküle bekannt, die durch Bindung an APAF-1 den intrinsischen Apoptosesignalweg hemmen können. Beispielsweise wurde dies für die Hitzeschockproteine HSP70 und 90 gezeigt, die durch Bindung an APAF-1 die Zusammenlagerung des Apoptosoms hemmen können und somit die Bindung von Procaspase 9 an APAF-1 verhindern (Beere et al., 2000). Auch das APAF-1-interacting-Protein (AIP) ist ein zellulärer Inhibitor des Apoptosoms. Es bindet an die CAR-Domäne von APAF-1 und hemmt so die Rekrutierung von Procaspase 9 (Cao et al., 2004). Es ist außerdem denkbar, dass ein Parasitenmolekül die Affinität von APAF-1 zu Cytochrom c hemmt und somit die Aktivierung von APAF-1 blockiert. So könnte die Bindung von Cytochrom c an APAF-1 durch ein Parasiten-Molekül kompetitiv inhibiert werden. Damit würde die Oligomerisierung aus APAF-1/Cytochrom c-Heterodimer inhibiert sein. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass *T. gondii* die Caspase-Aktivität im zellfreien System mit steigender Cytochrom c-Konzentration zunehmend schwächer hemmte (Schaumburg, 2007). Diese Art der Hemmung wurde auch für HSP90 diskutiert, das kompetitiv mit Cytochrom c an APAF-1 bindet (Pandey et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass Cytochrom c nur transient an APAF-1 bindet (Potokar et al., 2006). Dies könnte auch eine Dissoziation des gebildeten Apoptosoms nach Zugabe des Parasiten-Lysates erklären. Ein Parasitenmolekül könnte Cytochrom c verdrängen und so zur Dissoziation führen. Eine Bindung an Caspase 9 scheint eher unwahrscheinlich. Hierfür spricht auch, dass bei einer Immunkopräzipitation in früheren Arbeiten kein Parasitenmolekül im Präzipitat gefunden werden konnte (Schaumburg, 2007). Um eine direkte Interaktion mit APAF-1 zu untersuchen und die Frage zu klären, ob die Oligomerisierung zum Apoptosom durch den Parasiten inhibiert ist, könnten auf Grundlage dieses Testsystems auch Gelfiltrationsexperimente herangezogen werden (Beere et al., 2000).

4.4 Identifizierung von parasitären Effektormolekülen

In früheren Untersuchungen wurde herausgefunden, dass ausschließlich lebende, intrazelluläre Parasiten die Apoptose inhibieren. Durch Pyrimethamin und Ciprofloxacin abgetötete intrazelluläre *T. gondii* sind nicht fähig, die Apoptose zu hemmen (Nash, Purner et al. 1998). Es wurde nachgewiesen, dass eine wichtige Voraussetzung für die Hemmung durch den Parasiten die Invasion des Parasiten darstellt (Goebel, Lüder et al. 1999). Dadurch wurde auf eine direkte Interaktion von *T. gondii* mit der Apoptosesignalkette seiner Wirtszelle geschlossen (Lüder and Gross 2005). Es wurden Untersuchungen zur Veränderung innerhalb des intrinsischen Signalweges nach Infektion mit *T. gondii* durchgeführt, die zeigten, dass verschieden behandelte Toxoplasmen unterschiedliche Effekte auf die Staurosporin-induzierte Caspase 3/7-Aktivität besaßen. Hitzeinaktivierte Parasiten waren nicht in der Lage, die Zelle zu invadieren und zeigten keine Hemmung der Caspase-Aktivität. UV-behandelte Parasiten, die die Wirtszellen normal invadieren können, sich aber nicht vermehren, konnten die Apoptose allerdings effektiv hemmen. Dies zeigte, dass die Replikationsfähigkeit des Parasiten keine notwendige Voraussetzung für die Apoptosehemmung darstellt (Goebel et al., 1999). Diese Hinweise auf eine direkte Interaktion des Parasiten mit der Apoptosesignalkaskade der Wirtszelle konnte durch Untersuchungen bestätigt werden, in denen gezeigt wurde, dass Kulturüberstände von kultivierten, extrazellulären Parasiten die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität dosisabhängig hemmten (Keller et al., 2006). Exkretorisch-sekretorische (ES) Moleküle aus den Mikronemen, Rhoptrien oder Dichten Granula von *T. gondii* beeinflussten unmittelbar die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase-Kaskade unabhängig von einer veränderten Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien oder einer Hochregulation von anti-apoptotischen Molekülen durch die Wirtszelle (Keller et al., 2006). Es konnte in dieser Arbeit herausgestellt werden, dass nicht nur Tachyzoiten, sondern auch Gesamtlysat von *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System dosisabhängig hemmt. Aufgrund dieser deutlichen Hinweise auf die direkte Beteiligung von Parasitenmolekülen an der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität wurden in Vorarbeiten potentielle Effektormoleküle von *T. gondii* identifiziert. Durch einen Proteaseverdau mit Proteinase K wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem Effektormolekül des Parasiten, das für die Hemmung der Caspase-Aktivität

verantwortlich ist, um ein Protein des Parasiten handelt (Schaumburg, 2007). Weitere Untersuchungen identifizierten die NTPase und HSP70 von *T. gondii* als potentielle anti-apoptotische Kandidaten, die für die Hemmung der Caspase-Kaskade verantwortlich sein könnten (Schaumburg, Dissertation, Medizinische Fakultät, Göttingen). Zum einen spricht für diese Annahme, dass durch Immunpräzipitation von APAF-1 in Gegenwart von *T. gondii* ein Parasiten-Protein von etwa 63 kDa präzipitiert wurde (Schaumburg, 2007). Zum anderen ist die NTPase ein Dichte-Granula-Protein von *T. gondii* und hat sogenannte Apyrase-Aktivität. Das Enzym ist eine Nukleosidtriphosphat-Hydrolase mit einer breiten Substratspezifität für Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphate und kann sowohl Triphosphate (dATP), als auch Diphosphate (dADP) hydrolysieren (Asai et al., 1983). Die NTPase besitzt ein Signalpeptid und wird aus den Dichten Granula in die parasitophore Vakuole sekretiert (Ferguson et al. 1999) und ist ein Tetramer aus vier 63 kDa-Untereinheiten (Nakaar et al., 1998). Dies entsprach sehr genau den Charakterisierungen der in Frage kommenden Effektormoleküle (Schaumburg, 2007). Bei HSP70 handelt es sich um ein Hitzeschockprotein von *T. gondii*, das als Chaperon für viele Proteininteraktionen in Frage kommt. Es ist bekannt, dass HSP70 die Apoptose in Säugerzellen verhindern kann. Untersuchungen haben ergeben, dass HSP70 an APAF-1, der Schlüsselkomponente des mitochondrialen Apoptoseweges, bindet und somit die Cytochrom c und dATP-vermittelte Aktivierung von Procaspase 9 unterbinden kann (Hwang et al., 2010).

4.5 Die NTPase von *T. gondii* ist an der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität beteiligt

Mittels Immundepletion konnte in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden, dass die NTPase an der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch den Parasiten beteiligt ist. Durch Western Blot-Analyse wurde eine effiziente Depletion der NTPase aus Gesamtlysat von *T. gondii* nachgewiesen. Dieses NTPase-depletierte Parasitenlysat war nicht in der Lage, die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität effektiv zu hemmen. Dies zeigte, dass die NTPase für die Hemmung der Caspase-Kaskade benötigt wird, aber nicht, ob das Protein auch alleine dafür verantwortlich ist, da die NTPase auch einen

Kofaktor bei der Hemmung darstellen könnte. Diese Ergebnisse bestätigten aber, dass die NTPase von *T. gondii* ein potentiell anti-apoptotisches Molekül des Parasiten darstellt.

4.5.1 Die Hydrolase-Aktivität der NTPase spielt bei der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität keine Rolle

Da in dieser Arbeit eine Beteiligung der NTPase aus *T. gondii* an der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System nachgewiesen werden konnte, war es wichtig herauszufinden, auf welche Weise das Enzym die Caspase-Aktivität hemmt. Der mitochondriale Apoptosesignalweg ist ATP-abhängig und es stellte sich die Frage, ob *T. gondii* die Caspase 3/7-Aktivität durch Hydrolyse von dATP hemmt. Um zu untersuchen, ob die Hydrolase-Aktivität von *Toxoplasma gondii* eine Rolle bei der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität spielt, wurden Analysen mit dem nicht hydrolysierbarem ATP-Analogen Adenosin 5'-(β,γ -imido)triphosphat durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es auch in Gegenwart ADP und von nicht-hydrolysierbarem ATP zur Bildung des Apoptosoms und somit zur Aktivierung der Apoptosesignalkaskade kommt (Reubold et al., 2009). Dies konnte mit den Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigt werden. Wichtiger war jedoch der Nachweis, dass auch nach Aktivierung der Caspase-Kaskade mit App(NH)p die Caspase 3/7-Aktivität durch den Parasiten im zellfreien System deutlich dosisabhängig gehemmt wurde. Dies spricht gegen eine Hemmung aufgrund der Hydrolase-Aktivität der NTPase, vielmehr könnte es sich um eine sterische Hemmung der Apoptosombildung durch Bindung der NTPase an APAF-1, Cytochrom c oder Caspase 9 handeln. Eine sterische Hemmung von APAF-1 wurde beispielsweise schon für das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) analysiert, was durch Bildung eines cytosolischen Komplexes mit APAF-1 die Cytochrom c-vermittelte Oligomerisierung und somit die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 verhindert (Pandey et al., 2000). Hitzeschockproteine sind eine Familie von hochkonservierten Proteine, die in Prokaryoten und Eukaryoten an der zellulären Antwort auf Umweltstress beteiligt sind (Beere et al., 2000).

Gegen eine Hemmung der Caspase-Kaskade aufgrund der Hydrolase-Aktivität der *T. gondii* NTPase sprach auch, dass bei steigenden ATP-Konzentrationen die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität durch den Parasiten nicht reduziert wurde. In

dieser Arbeit zeigte sogar der Einsatz von 1 mM ATP, der vierfachen Menge der normal verwendeten Konzentration keine Veränderung im Hemmverhalten. Gegen die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität durch die Hydrolase-Aktivität der NTPase sprechen auch frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch *T. gondii* in Gegenwart von Dithiolen (Dithiothreitol) und Monothiolen (β -Mercaptoethanol) untersucht wurde (Schaumburg, 2007). Es ist bekannt, dass die NTPase *in vitro* nur durch Dithiole aktiviert werden kann und sonst gänzlich an Enzymaktivität verliert (Asai et al., 1983; Silverman et al., 1998). Da die NTPase von *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivierung auch in Gegenwart von Monothiolen deutlich hemmte (Schaumburg, 2007), ist die Hydrolase-Aktivität offensichtlich nicht für die Hemmung der Caspase-Aktivierung essentiell. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die Hydrolase-Aktivität der *Toxoplasma* NTPase offensichtlich an der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität nicht beteiligt ist.

T. gondii wird hauptsächlich in drei klonale Linien eingeteilt, die zu etwa 95% genetisch identisch sind. In Europa und Nordamerika kommen Toxoplasmen vom Typ II bei weitem am häufigsten vor. Trotz der genetischen Identität unterscheiden sich diese Linien in Bezug auf ihre Virulenz. Parasiten des Typ I sind in der Maus die virulentesten Stämme von *T. gondii* (Sibley and Ajioka, 2008). Die Nukleosidtriphosphat-Hydrolase (NTPase EC 3.6.1.15) von *T. gondii* kommt in zwei Isoformen, NTPase I und NTPase II, vor (Asai et al., 1995; Asai et al., 2002). Die beiden Isoformen haben eine nahezu identische Molekularmasse und bestehen aus vier identischen Untereinheiten von jeweils 66 kDa. Die NTPase I und NTPase II unterscheiden sich lediglich in 16 von 628 Aminosäuren. NTPase II wurde in allen *T. gondii* Stämmen beschrieben, während NTPase I nur den virulenten Typ I-Stämmen zugeschrieben wird (Asai et al., 1995). Dies muss allerdings nach neueren Sequenzanalysen in Frage gestellt werden, da die NTPase I auch in Maus-avirulenten *Toxoplasma*-Stämmen vorzukommen scheint (www.ToxoDB.org). Es wird diskutiert, ob die verschiedenen Isoformen der NTPase mit den Unterschieden in der Pathogenität der verschiedenen *T. gondii*-Stämme korrelieren (Asai and Suzuki, 1990). In dieser Arbeit wurde für die Versuche meist der NTE-Stamm eingesetzt, der zu den avirulenten Typ II-Stämmen von *T. gondii* gehört. Nach den MALDI-ToF-Analysen in den Vorarbeiten, die ebenfalls mit dem Lysat des NTE-Stammes von *T. gondii* vorgenommen wurden, wurde die NTPase I detektiert (Schaumburg, 2007). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Stämme der unterschiedlichen klonalen Linien von *T. gondii* die Cytochrom c-

induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System gleichermaßen dosisabhängig hemmen können. Damit konnte klar dargestellt werden, dass die Fähigkeit zur Hemmung nicht von der jeweilig exprimierten Isoform der NTPase in den unterschiedlichen Stämmen von *T. gondii* abhängig ist.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die verschiedenen Isoformen der NTPase auch unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen (Silverman et al., 1998). Die NTPase I hydrolisiert Nukleosid Triphosphate sehr schnell in Diphosphate. Sie besitzt eine Präferenz für ATP als Substrat und hydrolysiert dies etwa 75 mal effizienter als ADP (Asai et al., 1995). Die NTPase II besitzt dagegen eine deutlich niedrigere Rate bei der Hydrolyse von Triphosphaten, wobei sich diese nicht von der Hydrolyseaktivität gegenüber Diphosphaten unterscheidet (Asai et al., 1995; Nakaar et al., 1998; Silverman et al., 1998). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Hydrolase-Aktivität und die unterschiedliche Substratspezifität der NTPase bei der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität keine Rolle spielt, da sonst deutliche Unterschiede in der Hemmfähigkeit durch unterschiedliche *T. gondii*-Stämme hätten auftreten müssen.

4.6 Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch eine rekombinante NTPase

Die Proteine NTPase und HSP70 von *T. gondii* wurden in dieser Arbeit rekombinant hergestellt. Dazu wurden die Gene in den pQE30 Vektor inseriert und bei der Klonierung mit einem N-terminalen His₆-Tag versehen. Die NTPase wird in Einschlusskörperchen exprimiert (Nakaar et al., 1998). Dies konnte allerdings in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es gelang unter Verwendung verschiedener Expressionsmethoden lediglich eine allgemein geringe Expression der rekombinanten NTPase in *E. coli*. Dies könnte durchaus verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann die beschriebene Expression in Einschlusskörperchen darauf hindeuten, dass die rekombinante NTPase toxisch für *E. coli* ist. Einschlusskörperchen finden in Bakterien Verwendung für die Produktion von toxischen oder instabilen Proteinen. Es ist durchaus nicht ungewöhnlich, dass die Faltung von überexprimierten rekombinanten Proteinen fehlschlägt und diese eine proteolytische Degradierung durchlaufen oder sich mit anderen Proteinen zu unlöslichen Aggregaten von nicht-nativen Proteinen als Einschlusskörperchen verbinden (Baneyx and Mujacic, 2004).

Die Sequenz der NTPase enthält drei hydrophobe Regionen (Bermudes et al., 1994). Es ist bekannt, dass rekombinante Proteine mit hydrophoben Regionen oftmals einen toxischen Effekt auf die Wirtszelle haben, unter anderem durch die Assoziation des Proteins mit Membransystemen. Probleme bei der Expression von rekombinanten Proteinen in korrekter Konformation kann es in dem reduzierenden Milieu des Cytoplasmas von *E. coli* ebenfalls geben, da das Protein Disulfidbrücken-Bindungen enthält (Johnson et al., 1999). Auch könnte eine inkorrekte Faltung des Proteins in *E. coli* durch fehlende oder unzureichende posttranslationale Modifikationen hervorgerufen werden, wie z. B. Glykosylierungen, da die NTPase eine potentielle N-Glykosylierungsstelle an der Position von Aminosäure 432 besitzt (Bermudes et al., 1994; Johnson et al., 1999).

In dieser Arbeit konnte nach Ultraschallbehandlung von NTPase exprimierenden *E. coli* Zellen gezeigt werden, dass der Rohextrakt dieser Zellen die Caspase 3/7-Aktivität hemmt. Dies unterstützte weiterhin, dass die NTPase an der Hemmung der Caspase-Aktivität beteiligt ist. Der Einfluss eines anderen Moleküls, beispielsweise aus *E. coli*, konnte hier ausgeschlossen werden, da der Rohextrakt von Kontrollzellen, die mit dem leeren Expressionsvektor transformiert wurden, keinen Effekt auf die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität zeigten. Aufgrund dieses Hinweises sollten Untersuchungen mit dem gereinigten Protein folgen. Die Reinigung der rekombinanten NTPase erfolgte zunächst unter denaturierenden Bedingungen. In dieser Arbeit konnte ein hemmender Effekt des aufgereinigten rekombinanten Proteins auf die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität gezeigt werden. Dies bestätigte die Annahme, dass die NTPase an der Hemmung der Caspase-Aktivität durch den Parasiten beteiligt ist. Allerdings konnten nur geringe Mengen der rekombinanten NTPase isoliert werden. Der hemmende Effekt war daher eher gering. In dieser Arbeit wurde ein Fusionsprotein mit einem His₆-Tag am N-Terminus exprimiert. Da die Hydrolase-Aktivität für die Hemmung der Caspase-Kaskade durch *T. gondii* offensichtlich nicht erforderlich war, sondern eher eine sterische Hemmung der Apoptosombildung zugrundeliegen dürfte, könnte die Lokalisation des Tags am N-Terminus des Proteins problematisch sein. Es ist bisher nicht bekannt, in welcher Weise die NTPase sterisch die Apoptosombildung verhindert, allerdings könnte eine entsprechende Bindestelle durch den Tag besetzt gewesen sein. Die Reinigung der rekombinanten NTPase unter nativen Bedingungen zeigte ähnliche Probleme und es konnte nur eine geringe Menge des Proteins isoliert werden. Die native gereinigte, rekombinante NTPase zeigte keinen Effekt auf die Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität. Für eine erfolgreiche Bindung des His₆-Tags an Ni-NTA-Agarose ist die gute

Zugänglichkeit des Tags unerlässlich. Es könnte daher auch sein, dass der Tag in dem gefalteten Protein nicht oder nur schlecht zugänglich war und dadurch nur geringe Mengen des Proteins isoliert werden konnten. Die Expression von rekombinantem HSP70 war in dieser Arbeit deutlich effektiver. Das Protein konnte in ausreichenden Mengen rekombinant hergestellt werden und unter denaturierenden sowie unter nativen Bedingungen erfolgreich gereinigt werden. Allerdings hemmte rekombinantes HSP70 die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität nicht. Dies deutete darauf hin, dass HSP70 von *T. gondii* keine Rolle bei der Hemmung der Caspase 3/7-Aktivität durch den Parasiten spielt. Gegen eine Beteiligung von HSP70 an der Hemmung der Wirtszellapoptose spricht auch die Tatsache, dass bei der Identifizierung eines potentiellen Effektormoleküls ein Parasitenprotein charakterisiert wurde, was sich in der nativen Form als Oligomer aus 2-4 identischen etwa 65 kDa-Untereinheiten darstellte (Schaumburg, 2007). Bei HSP70 von *T. gondii* handelt es sich dagegen um ein Monomer mit einer Masse von 72 kDa (Weiss et al., 1998). Außerdem ist HSP70 im Cytosol und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Zhou et al., 2005).

Aufgrund der Probleme bei der Herstellung der rekombinanten NTPase wurde in Zusammenarbeit mit T. Asai, Tokyo eine funktionelle rekombinante NTPase auf ihren Einfluss auf die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität hin untersucht. Es konnte in dieser Arbeit deutlich und erstmalig gezeigt werden, dass die NTPase die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System dosisabhängig und hoch signifikant hemmt. Somit gelang der Nachweis, dass die *Toxoplasma* NTPase notwendig und hinreichend ist, um die Cytochrom c-abhängige Caspase-Aktivierung zu unterbinden. Der mengenmäßige Vergleich von rekombinanter NTPase und Gesamtlusat von *T. gondii* in der Western Blot-Analyse und der Hemmung der Caspase-Aktivität zeigte, dass die gereinigte rekombinante NTPase die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System weniger stark hemmte, als die endogene NTPase aus *Toxoplasma*-Lysat. Allerdings war die Hemmung bei Einsatz von 1 µg rekombinanter NTPase hoch signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die NTPase ein potentielles anti-apoptotisches Effektormolekül von *T. gondii* darstellt und die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität durch den Parasiten vermittelt. Die Unterschiede bei der Hemmung der Caspase-Aktivität durch die funktionell aktive, rekombinante NTPase und der in dieser Arbeit selbst exprimierten und gereinigten NTPase könnte zum Einen an der Wahl des Expressionsvektors liegen. In dieser Arbeit wurde hierfür ein Vektor mit einem His₆-Tag verwendet. Dieser Fusionstag am Protein könnte

die korrekte Faltung und die erfolgreiche Reinigung verhindert bzw. erschwert haben, wie oben erwähnt. Auch könnte die Bindestelle an das Targetmolekül des Apoptosams blockiert gewesen sein. Zum anderen wurde die funktionelle NTPase in Einschlusskörperchen exprimiert, daraus isoliert und anschließend gefaltet. Somit konnte hier eine korrekte Faltung des rekombinanten Proteins gewährleistet werden (Matoba et al., 2010). Es wäre auch denkbar, andere Expressionssysteme zu verwenden, um das rekombinante Protein herzustellen. Hier wäre beispielsweise die Expression in Insektenzellen zu nennen, die schon in früheren Arbeiten erfolgreich angewendet wurde (Reubold et al., 2009)

Um den Einfluss der *T. gondii* NTPase in eukaryotischen Zellen weiter zu untersuchen, sollte das Protein in menschlichen Jurkat- oder HeLa-Zellen heterolog exprimiert werden. Dabei wurde das Proteo Tuner Expressionssystem angewendet. Der pPTuner ist ein Expressionsvektor, der die präzise Regulation der Menge des zu untersuchenden Proteins in Säugerzellen und somit die direkte Untersuchung der Funktion eines Proteins ermöglichen soll. Das System basiert auf einer 12 kDa Destabilisierungsdomäne, welche als Fusionsdomäne am zu untersuchenden Protein exprimiert wird und den Verdau des Proteins durch das Proteasom vermittelt (Banaszynski et al., 2006). Durch Zugabe eines 750 Dalton großen, Membran-permeablen Stabilisierungsliganden, dem sogenannten Shield1, wird die Destabilisierungsdomäne inaktiviert, so dass das Protein exprimiert wird und sich in der Zelle anreichert. Die Menge des akkumulierenden Proteins ist proportional zur Menge an zugegebenen Shield1. Die Fusion der Liganden-kontrollierten Destabilisierungsdomäne mit dem zu untersuchenden Protein ermöglicht also die schnelle, reversible und konstante Proteinexpression. Es ist somit möglich, den Proteinlevel in Säugerzellen zu regulieren und eine effiziente funktionelle Analyse des Proteins durchzuführen (Herm-Gotz et al., 2002; Herm-Gotz et al., 2007). In dieser Arbeit wurde das Gen für die NTPase von *T. gondii* erfolgreich in den Expressionsvektor eingebracht und in Jurkat- bzw. HeLa-Zellen mittels Transfektion integriert. Dies konnte auf DNA und RNA-Ebene mittels PCR-Analyse bestätigt werden. Trotz unterschiedlicher Bedingungen konnte jedoch keine Expression der NTPase in Säugerzellen erreicht werden. Dies könnte beispielsweise an der Position der Destabilisierungsdomäne liegen. Es ist nicht auszuschließen, dass die NTPase eine Fusion an dem N-Terminus nicht toleriert. Auch könnte das Protein während der Fusion seine Funktionalität verlieren, insbesondere, wenn es sich um ein Multimer handelt (Hagan et al., 2009). Die NTPase ist ein Tetramer und besteht aus vier identischen Untereinheiten (Asai et al., 1995), was ein Problem bei der

Expression darstellen könnte. Weiterhin kann ein toxischer Effekt der überexprimierten, rekombinanten NTPase in den Wirtszellen nicht ausgeschlossen werden. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass aus den genannten Gründen nur eine sehr schwache Expression erreicht wurde, die durch Immunblot nicht nachzuweisen war. Bis heute wurde dieses System erfolgreich für verschiedene intrazelluläre und sekretierte Proteine von intrazellulären Parasiten, wie z.B. die Protease Falcipain-2 von *Plasmodium falciparum* in unterschiedlichen Zellen angewendet (Armstrong and Goldberg, 2007). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass diese Methode für jedes Protein in der Zelle erfolgreich angewendet werden kann (Herm-Gotz et al., 2007). Damit war diese Methode nicht geeignet, um einen Effekt der NTPase von *T. gondii* auf die Apoptosesignalkaskade in lebenden eukaryotischen Zellen näher zu untersuchen. Es müssen daher andere Wege zur Charakterisierung des Effektormoleküls von *T. gondii* in Säugerzellen gefunden werden. Hierbei könnten beispielsweise andere Transfektionsverfahren wie die Calcium-Phosphat-Präzipitation angewendet werden. Aber auch das Einbringen mittels Elektroporation in die Wirtszelle wäre denkbar.

4.7 Voraussetzung für die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung durch *T. gondii* NTPase *in vivo*

Eine bisher ungeklärte Frage ist, ob und wenn ja wie die NTPase von *T. gondii in vivo* aus der parasitophoren Vakuole (PV) in die Wirtszelle gelangt. Unter Annahme einer sterischen Hemmung der Apoptosombildung durch die NTPase muss diese direkten Kontakt zum Wirtszell-Cytoplasma und den Komponenten des Apoptosoms haben. Da die Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) nur für Moleküle bis zu einer Größe von 1300 Da frei durchlässig ist (Joiner et al., 1994), muss die NTPase durch einen anderen Mechanismus als Diffusion in die Wirtszelle gelangen. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass ROP 16, ein Virulenzfaktor aus den Rhoptrien, und auch die Proteinkinase ROP18 bei der Invasion von *T. gondii* in das Cytosol der Wirtszelle injiziert werden und die Expression bestimmter Gene regulieren können (Taylor et al., 2006; Saeij et al., 2007). Auch ist beschrieben worden, dass ein Rhoptrien-lokalisiertes PP2C Protein des Parasiten während der Infektion in das Cytosol der Wirtszelle und nachfolgend in den Zellkern der Wirtszelle gelangt (Gilbert et al., 2007). Diese Resultate können darauf zurückgeführt werden, dass

der Parasit zu Beginn der Invasion Rhoptrien-Proteine in Form von sogenannten Evacuolen in das Cytosol der Zelle entlässt. Diese Evacuolen sind, wie die parasitophore Vakuole auch, vor der Fusion mit Endosomen oder Lysosomen der Wirtszelle geschützt und können später mit der PV fusionieren, wobei wahrscheinlich auch der Einbau einiger Rhoptrien-Proteine in die PVM stattfindet. Auch wird hierbei ein Teil der Proteine direkt ins Wirtszell-Cytoplasma abgegeben (Hakansson et al., 2001). Diese Untersuchungen zeigen deutlich, dass *T. gondii* in der Lage ist, Proteine direkt in das Cytosol der Zelle zu bringen und mit der Wirtszelle zu interagieren. Die Evakuolen des Parasiten könnten einen möglichen Eintrittsweg der NTPase in die Wirtszelle darstellen, dagegen spricht allerdings, dass die Evakuolen hauptsächlich Rhoptrienproteine enthalten und in der frühen Phase des Eintritts des Parasiten in die Zelle und dem Aufbau der PV gebildet und ins Wirtszellcytosol abgegeben werden. Es ist aber bekannt, dass die NTPase in den Dichten Granula des Parasiten lokalisiert ist (Asai et al., 1983; Nakaar et al., 1998) und zeitlich erst nach den Proteinen aus den Rhoptrien in die parasitophore Vakuole sekretiert wird, was elektronenmikroskopische Aufnahmen und Immunofluoreszenztests zeigen konnten. Aufgrund der engen Assoziation zwischen PVM und Wirtszellmitochondrien (Sinai and Joiner, 2001) wäre eine Modulation der Wirtszellapoptosesignalkaskade auch durch parasitäre Membranproteine der PVM denkbar. Es ist bekannt, dass Parasitenproteine in die PVM integriert werden und Kontakt mit dem Wirtszell-Cytosol besitzen. Hierbei muss allerdings gewährleistet sein, dass die NTPase in das Cytosol der Wirtszelle reicht, um einen Kontakt mit den Signalkaskaden der Zelle herstellen zu können. Tatsächlich wird eine Assoziation der NTPase mit der PVM diskutiert (Bermudes et al., 1994). Außerdem konnte in infizierten Zellen mittels Immunfluoreszenztest in neueren Untersuchungen eine Lokalisation der *T. gondii* NTPase in der PVM beobachtet werden (Carsten Lüder, persönliche Mitteilung). Hierfür spräche auch die Struktur der NTPase. Es ist gezeigt worden, dass alle Isoformen des Proteins drei hydrophobe Regionen (AS 178-191, 278-290 und 319-337) enthalten, die lang genug sind, um als membrandurchspannende Domänen zu dienen (Bermudes et al., 1994). Es spricht also einiges dafür, dass die NTPase *in vivo* in die Membran der parasitophoren Vakuole integriert wird und in das Cytosol der Wirtszelle reicht. Dies wurde schon für ein Rhoptrienprotein (ROP 2) von *T. gondii* gezeigt (Beckers et al., 1994). Auch für andere Proteine aus den Dichten Granula ist eine Assoziation mit der Membran der parasitophoren Vakuole beschrieben worden. GRA4 und GRA 6 bilden zusammen mit GRA2 einen Proteinkomplex und sind stabil in der Membran integriert (Labruyere et al., 1999). Auch GRA3, GRA5 und GRA10 sind an dem Aufbau der PVM

beteiligt und zeigen nach Sekretion des Parasiten eine direkte Assoziation mit der PVM, wodurch eine Interaktion mit der Wirtszelle diskutiert wird (Lecordier et al., 1993; Ahn et al., 2005). Um diese Frage aber genau zu klären, müssen eingehendere Untersuchungen in Bezug auf die Lokalisation der NTPase in der infizierten Zelle durchgeführt werden. Hier könnte z.B. die Herstellung einer GFP-markierten rekombinanten NTPase von Nutzen sein.

4.8 Apoptoseinhibierung durch andere Parasiten

Auch andere Protozoen, wie Theilerien, Cryptosporidien, Trypanosomen und Leishmanien haben Strategien entwickelt, um sich ein Überleben und die Vermehrung in der Wirtszelle zu sichern. Sie sind in der Lage, die Wirtszelle auf vielfältige Weise zu beeinflussen, wie beispielsweise durch Induktion oder Inhibierung der Apoptose ebenso wie der gleichzeitigen Stimulierung von pro- und anti-apoptotischen Aktivitäten (Schaumburg et al., 2006; Graumann et al., 2009). Dabei wurden auch Interaktionen mit dem mitochondrialen Signalweg der Wirtszellapoptose für diese Protozoen beschrieben. Zum Beispiel ist die Hemmung der Apoptose durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges bei *T. cruzi* und *T. gondii* gezeigt worden (Kim and Denkers, 2006). Der Akt/PKB Signalweg kann über verschiedene Mechanismen die Apoptose direkt hemmen. Dies erfolgt nach Aktivierung membranständiger Tyrosinkinase durch die Phosphorylierung und Inhibition des proapoptotischen Bcl-2 Proteins Bad, wodurch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und damit die Aktivierung der Caspase 3 gehemmt ist (Song et al., 2005). Auch für *Leishmania major* wurde eine Hemmung der Cytochrom c-Freisetzung und somit der Caspase 3-Aktivierung gezeigt, was wahrscheinlich auf eine Phosphorylierung von Bcl-2 Proteinen zurückzuführen ist (Akarid et al., 2004). Nach Infektion mit Trophozoiten von *Cryptosporidium parvum* wurde eine erhöhte Expression von anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen und eine verminderte Aktivität der Caspase 3 festgestellt, wobei der genaue Mechanismus aber bisher noch nicht geklärt ist (Mele et al., 2004). Neben den zahlreichen Mechanismen zur Hemmung der Wirtszellapoptose von *T. gondii* kann also für viele andere Protozoen auch eine Interaktion mit dem mitochondrial-vermittelten Apoptosesignalweg dargestellt werden. Die genauen Hemmmechanismen und eventuell beteiligte parasitäre Effektormoleküle sind noch nicht vollständig geklärt und

eingehende Untersuchungen zur Inhibierung des Apoptosoms liegen bislang nicht vor. Für *T. gondii* konnte allerdings erstmals in dieser Arbeit eine effektive Hemmung der Cytochrom c-induzierten Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität gezeigt werden, was noch für keinen anderen Mikroorganismus beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass offensichtlich die Bildung des Apoptosoms in Gegenwart von *T. gondii* gehemmt wird. Hierbei spielt die NTPase, ein Parasitenprotein eine zentrale Rolle und hemmt die Apoptosombildung und verhindert damit die Bindung von Procaspase 9, einem essentiellen Schritt des mitochondrial-vermittelten Apoptosesignalweges.

4.9 Bewertung und Bedeutung der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung durch die *T. gondii* NTPase

Der intrinsische Apoptosesignalweg wird durch zellulären Stress, wie z. B. DNA-Schäden oder dem Mangel an Wachstumsfaktoren ausgelöst. Die Infektion mit intrazellulären Erregern stellt ebenfalls ein Stresssignal für die Zelle dar, welches den mitochondrialen Apoptoseweg induziert. Mit der Hemmung dieses Signalweges wird das Wachstum und die Replikation von intrazellulären Parasiten innerhalb ihrer Wirtszelle sichergestellt. Die Hemmung des Apoptosoms stellt also einen zentralen Mechanismus dar, der das Überleben von *T. gondii* in der Wirtszelle sichert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bildung des Apoptosoms und somit die Bindung von Procaspase 9 an APAF-1 im zellfreien System durch *T. gondii* gehemmt wird. Auch konnte in dieser Arbeit deutlich nachgewiesen werden, dass die NTPase von *T. gondii* die Hemmung des Apoptosoms vermittelt, wahrscheinlich durch Bindung an eine der Komponenten des Apoptosoms und sterische Hemmung. Es wurde herausgestellt, dass auch in infizierten Zellen die Caspase 3/7-Aktivität durch den Parasiten gehemmt ist und dieser Mechanismus in der Wirtszelle einen bedeutenden und zentralen Schritt bei der Hemmung der Wirtzellapoptose darstellt und somit ein intrazelluläres Überleben von *T. gondii* sichert. In der intakten Wirtszelle sind die Verhältnisse allerdings wesentlich komplexer als im zellfreien System. Hier muss sichergestellt sein, dass die NTPase direkten Kontakt mit der Apoptosekaskade der Wirtszelle hat. Es müssen daher weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Beteiligung der NTPase an der Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase 3/7-Aktivität in infizierten Zellen genauer zu analysieren. So sollte beispielsweise der genaue

Hemmmechanismus weiter untersucht werden. Die Klärung der Frage, wie die NTPase an APAF-1 oder eine andere Komponente des Apoptosoms bindet und damit eine Hemmung der Apoptosomzusammenlagerung hervorruft, könnte einen effektiven Angriffspunkt für eine Therapie gegen Toxoplasmose darstellen. Hierbei könnte das auch in dieser Arbeit verwendete rekonstituierte Testsystem mit rekombinantem APAF-1 und Caspase 9 dienen. Hier wäre es beispielsweise möglich, durch die Verwendung einer rekombinanten, funktionellen NTPase im Testsystem die Bindung des Proteins genauer und eingehend zu untersuchen. Die genaue Kenntnis über ein Effektormolekül von *Toxoplasma* zur Apoptoseinhibierung und die Möglichkeit diese auszuschalten, könnte möglicherweise zu neuen Therapien beitragen, die durch gezielte Abtötung infizierter Zellen das Aufnehmen von intrazellulären Parasiten durch Phagozyten ermöglichen. Effektormoleküle, die für die Inhibierung des intrinsischen Apoptoseweges verantwortlich sind, sind für einige Viren identifiziert worden. Das Fehlen dieser Effektormoleküle zeigte eine Induktion der Apoptose nach einer Infektion. An *Plasmodium berghei* konnte nach einer Deletion des Gens für das Oberflächenprotein P36p gezeigt werden, dass infizierte Hepatozyten deutlich höhere Level an Apoptose erreichten (Douradinha et al., 2007). Es ist daher denkbar, weiterführende Untersuchungen mit konditionellen NTPase knock-out Mutanten durchzuführen. Die genaue Kenntnis eines Effektormoleküls von *T. gondii* könnte auch als Vorlage zur Entwicklung von anti-apoptotischen Medikamenten dienen. Zur Prävention einer Infektion durch *T. gondii* stehen zur Zeit für den Menschen keine Impfstoffe zur Verfügung, lediglich für die Veterinärmedizin gibt es eine Impfung mit einem abgeschwächtem S48-Stamm des Parasiten (Kur et al., 2009). Die Therapie der Toxoplasmose besteht bisher hauptsächlich aus Inhibitoren der Proteinbiosynthese (Spiramycin und Clindamycin) und der Folsäuresynthese (Pyrimethamin, Sulfadiazin) (Montoya and Liesenfeld, 2004). Sollte die nachgewiesene Hemmung des Apoptosoms durch *T. gondii* aufgehoben werden können, wäre die Induktion der Wirtszellapoptose im Rahmen einer Stressantwort der Wirtszelle möglich und es könnte zu einer effektiveren Beseitigung der Parasiten führen.

5. Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der nahezu alle kernhaltigen Zellen des Menschen und von homoiothermen Tieren infizieren kann. Eine Infektion führt im immungesunden Menschen meist zu einer klinisch inapparenten lebenslangen Persistenz des Parasiten vor allem im Zentralnervensystem und in der Muskulatur seiner Wirte. Dies setzt erfolgreiche Evasionstrategien des Parasiten voraus, um der Immunabwehr zumindest teilweise zu entgehen. Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, die die Beseitigung geschädigter oder nicht mehr benötigter Zellen in mehrzelligen Organismen gewährleistet. Sie ist auch ein wichtiger Abwehrmechanismus der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene. Viele Infektionserreger, u.a. auch *T. gondii* sind in der Lage, die Apoptose der Wirtszelle effektiv zu hemmen und sich somit Überleben und Vermehrung im Wirt zu sichern. So inhibiert *T. gondii* in einem zellfreien *in vitro*-System die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase 9-Caspase 3/7-Kaskade dosisabhängig. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität auch in infizierten Zellen eine bedeutende Rolle spielt. In Caspase 9-retransfizierten Zellen war die Apoptose im Vergleich zu Caspase 9-defizienten Zellen um etwa 30% stärker gehemmt und damit auf eine Interaktion von *T. gondii* mit der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung zurückzuführen. Nach Elektroporation von Jurkat-Zellen in Medium mit und ohne Cytochrom c war die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität in infizierten Zellen sogar vollständig hemmt, ohne dass die Menge an cytosolischem Cytochrom c in der Wirtszelle durch den Parasiten verändert war. Außerdem konnte in cytosolischen Proteinlysaten infizierter und nicht-infizierter Jurkat-Zellen eine dosisabhängige Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität durch den Parasiten nachgewiesen werden. Untersuchungen zum zugrundeliegenden Mechanismus der verminderten Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung zeigten, dass in Gegenwart des Parasiten die Rekrutierung von Procaspase 9 an den „apoptosis-activating factor-1“ (APAF-1) und somit ein essentieller Schritt zur Aktivierung der Initiatorcaspase 9 gestört war. In einem rekonstituierten Testsystem, bestehend aus rekombinantem APAF-1, Caspase 9, sowie Cytochrom c hemmte Gesamtlysat von *T. gondii* die Aktivierung der Cytochrom c-induzierten Aktivierung der Caspase 9 dosisabhängig. Damit wurde in einem molekular definierten Testsystem erstmals nachgewiesen, dass *T. gondii* die Aktivierung der Caspase

9 verhindert und auch bei einem bereits präformierten Apoptosom die Caspase 9-Aktivierung hemmt. Das zellfreie *in vitro*-System wurde auch genutzt, um Effektorproteine der *T. gondii*-vermittelten Hemmung der Caspase-Kaskade zu charakterisieren. In früheren Arbeiten waren *T. gondii* NTPase und HSP70 als mögliche Effektoren identifiziert worden. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die NTPase von *T. gondii* ein anti-apoptisches Protein des Parasiten darstellt. Nach Immundepletion der NTPase war der hemmende Effekt von *T. gondii*-Gesamtlysat auf die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität fast vollständig aufgehoben. Untersuchungen mit dem nicht hydrolysierbarem ATP-Analogon App(NH)p, sowie mit hohen ATP-Konzentrationen deuteten darauf hin, dass die Hydrolase-Aktivität der NTPase von *T. gondii* keine Voraussetzung für die Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität darstellte. Da in Abhängigkeit von klonalen Linien von *T. gondii* unterschiedliche Isoformen mit unterschiedlichen Hydrolase-Aktivitäten exprimiert werden, wurde auch die Stammspezifität der Parasiten-induzierten Hemmung der Caspase-Kaskade untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Vertreter aller klonalen Linien von *T. gondii* die Cytochrom c-induzierte Caspase-Aktivität gleichermaßen dosisabhängig hemmen, unabhängig der Expression einer bestimmten Isoform der NTPase. In dieser Arbeit wurden anschließend die *T. gondii* NTPase und HSP70 in *E. coli* rekombinant hergestellt. Bakteriell exprimiertes *T. gondii* HSP70 hatte keinen Einfluss auf die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität. Rekombinante *T. gondii* NTPase I zeigte nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen dagegen eine Hemmung der Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivität. Außerdem inhibierte funktionell aktive, rekombinante NTPase die Cytochrom c-induzierte Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System dosisabhängig und ab einer Konzentration von 0,5 µg/ml signifikant. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass die NTPase von *T. gondii* ein anti-apoptisches Protein des Parasiten darstellt und die Cytochrom c-induzierte Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität im zellfreien System inhibiert. Dieser anti-apoptische Mechanismus dürfte auch in infizierten Zellen eine wichtige Rolle spielen und zur intrazellulären Vermehrung des Parasiten in der Wirtszelle beitragen.

6. Summary

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite and is able to infect almost all nucleated cells of humans and warm-blooded animals. Infection of immunocompetent individuals is mostly asymptomatic and leads to a lifelong persistence of the parasite particularly in the central nervous system and muscle cells of the host. *T. gondii* has evolved different strategies to evade the immune system of the host and to facilitate its own intracellular survival. Apoptosis is a common form of programmed cell death which eliminates damaged or unnecessary cells in a multicellular organism. Apoptosis also represents an important defense mechanism of both innate and adaptive immune responses to combat intracellular pathogens. Some pathogens including *T. gondii* are able to inhibit apoptosis of its host cell and thereby facilitate its own survival and development in the host. *T. gondii* inhibits cytochrome c-induced activation of the caspase 9-caspase 3/7-cascade in a cell-free system in a dose-dependent manner. In the present study it could be shown for the first time that inhibition of cytochrome c-induced caspase 3/7-activity by the parasite also plays an important role in infected cells. Studies in caspase 9-deficient Jurkat cells and caspase 9-retransfected cells showed a 30% stronger inhibition of apoptosis in caspase 9-expressing cells than in caspase 9-deficient cells thus indicating that this level of inhibition was due to parasite interference with caspase 3/7-activation. After electroporation of Jurkat cells in medium with and without cytochrome c, it was shown that the cytochrome c-induced caspase 3/7-activity was completely inhibited by the parasite without affecting cytosolic levels of cytochrome c in the host cell. In addition, we observed a dose-dependent inhibition of cytochrome c-induced caspase 3/7-activity in cytosolic lysates from cells infected with increasing numbers of the parasite. Efforts to unravel the molecular mechanism of the reduced activation of cytochrome c-induced caspase-activation in the presence of *T. gondii* showed that the recruitment of caspase 9 to the apoptosis activating factor-1 (APAF-1) and therefore activation of the initiator caspase 9 was inhibited by the parasite. In a reconstituted test system consisting of recombinant APAF-1, caspase 9 and cytochrome c, complete lysate of *T. gondii* inhibited cytochrome c-induced activation of caspase 9 dose-dependently. Thus, in a test system with defined components, our result displayed for the first time that *T. gondii* inhibits activation of caspase 9 and even blocks this activation after the apoptosome was already formed. The cell-free system was also used to characterize effector proteins of the *T. gondii*-mediated

inhibition of the caspase cascade. In previous studies, NTPase and HSP70 of *T. gondii* were identified as possible effectors for the anti-apoptotic effect of the parasite. This study revealed that the NTPase of *T. gondii* indeed represents an anti-apoptotic protein of the parasite. Immunodepletion of NTPase from *T. gondii* lysate showed a dose-dependent abrogation of the inhibitory effect of complete parasite lysate on cytochrome c-induced caspase activity. Investigations with a non-hydrolyzable ATP analogon, App(NH)p, as well as use of high concentration of ATP indicated that the hydrolase-activity of *T. gondii* NTPase was not required for the inhibition of cytochrome c-induced caspase activation. Clonal lineages of *T. gondii* express different isoforms of NTPase with different hydrolase activities. However, investigations on a possible strain specificity of the parasite-mediated inhibition of the caspase cascade showed comparable inhibition by members of the three different clonal lineages on cytochrome c-induced caspase activation. This inhibition thus occurred independent of the expression of a specific isoform of NTPase. In this study, recombinant NTPase and HSP70 of *T. gondii* were expressed in *E. coli*. Bacterial expressed *T. gondii* HSP70 had no effect on cytochrome c-induced caspase 3/7 activity. In contrast, after purification under denaturing conditions, recombinant *T. gondii* NTPase showed an inhibition of cytochrome c-induced caspase activity. Furthermore, a functionally active NTPase inhibited cytochrome c-induced activation of caspase 3/7 dose-dependently and at a concentration of 0,5 µg/ml or higher significantly. This result indicated for the first time that the NTPase of *T. gondii* represents an anti-apoptotic protein of the parasite that inhibits the cytochrome c-induced activation of caspase 3/7 in a cell-free system. This anti-apoptotic mechanism may play an important role in infected cells contributing to intracellular survival of *T. gondii* in the host cell.

7. Literaturverzeichnis

Adams, L. B., Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R. and Krahenbuhl, J. L. (1990). "Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine." J Immunol **144**(7): 2725-2729.

Adrain, C., Murphy, B. M. and Martin, S. J. (2005). Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. J Biol Chem. **280**: 4663-4673.

Ahn, H. J., Kim, S. and Nam, H. W. (2005). "Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*." Biochem Biophys Res Commun **331**(2): 614-620.

Akarid, K., Arnoult, D., Micic-Polianski, J., Sif, J., Estaquier, J. and Ameisen, J. C. (2004). "*Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c." J Leukoc Biol **76**(1): 95-103.

Amarante-Mendes, G. P. and Green, D. R. (1999). "The regulation of apoptotic cell death." Braz J Med Biol Res **32**(9): 1053-1061.

Antonsson, B. (2001). "Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion." Cell Tissue Res **306**(3): 347-361.

Appleford, P. J. and Smith, J. E. (1997). "*Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains." Acta Trop **65**(2): 97-104.

Armstrong, C. M. and Goldberg, D. E. (2007). "An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*." Nat Methods **4**(12): 1007-1009.

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

Asai, T., O'Sullivan, W. J. and Tatibana, M. (1983). "A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds." J Biol Chem **258**(11): 6816-6822.

Asai, T. and Suzuki, Y. (1990). "Remarkable activities of nucleoside triphosphate hydrolase in the tachyzoites of both virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*." FEMS Microbiol Lett **60**(1-2): 89-92.

Asai, T., Takeuchi, T., Diffenderfer, J. and Sibley, L. D. (2002). "Identification of small-molecule inhibitors of nucleoside triphosphate hydrolase in *Toxoplasma gondii*." Antimicrob Agents Chemother **46**(8): 2393-2399.

- Ashkenazi, A.** (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-430.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M.** (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Banaszynski, L. A., Chen, L. C., Maynard-Smith, L. A., Ooi, A. G. and Wandless, T. J.** (2006). "A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules." Cell **126**(5): 995-1004.
- Baneyx, F. and Mujacic, M.** (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." Nat Biotechnol **22**(11): 1399-1408.
- Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O. and Joiner, K. A.** (1994). "The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm." J Cell Biol **127**(4): 947-961.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M. and Green, D. R.** (2000). "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome." Nat Cell Biol **2**(8): 469-475.
- Benedict, C. A., Norris, P. S. and Ware, C. F.** (2002). "To kill or be killed: viral evasion of apoptosis." Nat Immunol **3**(11): 1013-1018.
- Bermudes, D., Peck, K. R., Afifi, M. A., Beckers, C. J. and Joiner, K. A.** (1994). "Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **269**(46): 29252-29260.
- Black, M. W. and Boothroyd, J. C.** (2000). "Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 607-623.
- Blackman, M. J. and Bannister, L. H.** (2001). "Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation." Mol Biochem Parasitol **117**(1): 11-25.
- Boatright, K. M. and Salvesen, G. S.** (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-731.
- Bohne, W., Holpert, M. and Gross, U.** (1999). "Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." Immunobiology **201**(2): 248-254.
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. and Cidlowski, J. A.** (1995). "The role of DNA fragmentation in apoptosis." Trends Cell Biol **5**(1): 21-26.
- Bradley, P. J. and Sibley, L. D.** (2007). "Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors." Curr Opin Microbiol **10**(6): 582-587.

- Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A. and Henson, P. M.** (1997). "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase." J Biol Chem **272**(42): 26159-26165.
- Bratton, S. B., Walker, G., Srinivasula, S. M., Sun, X. M., Butterworth, M., Alnemri, E. S. and Cohen, G. M.** (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." EMBO J **20**(5): 998-1009.
- Brunelle, J. K. and Letai, A.** (2009). "Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family." J Cell Sci **122**(Pt 4): 437-441.
- Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C. and Cohen, G. M.** (1999). "Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex." J Biol Chem **274**(32): 22686-22692.
- Cao, G., Xiao, M., Sun, F., Xiao, X., Pei, W., Li, J., Graham, S. H., Simon, R. P. and Chen, J.** (2004). "Cloning of a novel Apaf-1-interacting protein: a potent suppressor of apoptosis and ischemic neuronal cell death." J Neurosci **24**(27): 6189-6201.
- Carruthers, V. B. and Tomley, F. M.** (2008). "Microneme proteins in apicomplexans." Subcell Biochem **47**: 33-45.
- Charron, A. J. and Sibley, L. D.** (2004). "Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*." Traffic **5**(11): 855-867.
- Cohen, G. M.** (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." Biochem J **326** (Pt 1): 1-16.
- Commodaro, A. G., Belfort, R. N., Rizzo, L. V., Muccioli, C., Silveira, C., Burnier Jr, M. N. and Belfort Jr, R.** (2009). "Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(2): 345-350.
- Delhalle, S., Duvoix, A., Schnekenburger, M., Morceau, F., Dicato, M. and Diederich, M.** (2003). "An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1010**: 1-8.
- Denault, J. B. and Salvesen, G. S.** (2002). "Caspases: keys in the ignition of cell death." Chem Rev **102**(12): 4489-4500.
- Denkers, E. Y. and Gazzinelli, R. T.** (1998). "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection." Clin Microbiol Rev **11**(4): 569-588.
- Desmonts, G. and Couvreur, J.** (1974). "Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies." N Engl J Med **290**(20): 1110-1116.
- Douradinha, B., van Dijk, M. R., Ataide, R., van Gemert, G. J., Thompson, J., Franetich, J. F., Mazier, D., Luty, A. J., Sauerwein, R., Janse, C. J., Waters, A. P. and Mota, M. M.** (2007). "Genetically attenuated P36p-deficient *Plasmodium berghei* sporozoites confer long-lasting and partial cross-species protection." Int J Parasitol **37**(13): 1511-1519.

- Dubey, J. P.** (1998). "Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **28**(7): 1019-1024.
- Dubey, J. P.** (2002). "Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats." J Parasitol **88**(4): 713-717.
- Dubey, J. P.** (2006). "Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts." Vet Parasitol **140**(1-2): 69-75.
- 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**(2): 267-299.
- Earnshaw, W. C.** (1999). "Apoptosis. A cellular poison cupboard." Nature **397**(6718): 387, 389.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. and Kaufmann, S. H.** (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. and Liang, J.** (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **37**(11): 719-727.
- Frickel, E. M., Sahoo, N., Hopp, J., Gubbels, M. J., Craver, M. P., Knoll, L. J., Ploegh, H. L. and Grotenbreg, G. M.** (2008). "Parasite stage-specific recognition of endogenous *Toxoplasma gondii*-derived CD8+ T cell epitopes." J Infect Dis **198**(11): 1625-1633.
- Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M. and Sher, A.** (1991). "Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine." J Immunol **146**(1): 286-292.
- Gilbert, L. A., Ravindran, S., Turetzky, J. M., Boothroyd, J. C. and Bradley, P. J.** (2007). "*Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells." Eukaryot Cell **6**(1): 73-83.
- Goebel, S., Gross, U. and Lüder, C. G.** (2001). "Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression." J Cell Sci **114**(Pt 19): 3495-3505.
- Goebel, S., Lüder, C. G. and Gross, U.** (1999). "Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis." Med Microbiol Immunol **187**(4): 221-226.
- Goebel, S., Lüder, C. G., Lugert, R., Bohne, W. and Gross, U.** (1998). "*Toxoplasma gondii* inhibits the in vitro induced apoptosis of HL-60 cells." Tokai J Exp Clin Med **23**(6): 351-356.
- Grassme, H., Jendrossek, V. and Gulbins, E.** (2001). "Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis." Apoptosis **6**(6): 441-445.

- Graumann, K., Hippe, D., Gross, U. and Luder, C. G.** (2009). "Mammalian apoptotic signalling pathways: multiple targets of protozoan parasites to activate or deactivate host cell death." Microbes Infect **11**(13): 1079-1087.
- Green, D. R. and Reed, J. C.** (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-1312.
- Grimaldi, C. M., Hicks, R. and Diamond, B.** (2005). "B cell selection and susceptibility to autoimmunity." J Immunol **174**(4): 1775-1781.
- Gross, U.** (2004). "[Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis]." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **47**(7): 692-697.
- Gross, U. and Bohne, W.** (1994). "*Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation." J Eukaryot Microbiol **41**(5): 10S-11S.
- Gross, U., Bohne, W., Lüder, C. G., Lugert, R., Seeber, F., Dittrich, C., Pohl, F. and Ferguson, D. J.** (1996). "Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." J Eukaryot Microbiol **43**(5): 114S-116S.
- Gross, U., Holpert, M. and Goebel, S.** (2004). "Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis." Ann Ist Super Sanita **40**(1): 65-70.
- Gubbels, M. J., Striepen, B., Shastri, N., Turkoz, M. and Robey, E. A.** (2005). "Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*." Infect Immun **73**(2): 703-711.
- Hacker, G.** (2000). "The morphology of apoptosis." Cell Tissue Res **301**(1): 5-17.
- Hacker, G. and Fischer, S. F.** (2002). "Bacterial anti-apoptotic activities." FEMS Microbiol Lett **211**(1): 1-6.
- Hagan, E. L., Banaszynski, L. A., Chen, L. C., Maynard-Smith, L. A. and Wandless, T. J.** (2009). "Regulating protein stability in mammalian cells using small molecules." Cold Spring Harb Protoc **2009**(3): pdb prot5172.
- Hakansson, S., Charron, A. J. and Sibley, L. D.** (2001). "Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole." EMBO J **20**(12): 3132-3144.
- Hasnain, S. E., Begum, R., Ramaiah, K. V., Sahdev, S., Shajil, E. M., Taneja, T. K., Mohan, M., Athar, M., Sah, N. K. and Krishnaveni, M.** (2003). "Host-pathogen interactions during apoptosis." J Biosci **28**(3): 349-358.
- Hauser, W. E., Jr., Sharma, S. D. and Remington, J. S.** (1983). "Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*." J Immunol **131**(1): 458-463.
- Herm-Gotz, A., Agop-Nersesian, C., Munter, S., Grimley, J. S., Wandless, T. J., Frischknecht, F. and Meissner, M.** (2007). "Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*." Nat Methods **4**(12): 1003-1005.

- Herm-Gotz, A., Weiss, S., Stratmann, R., Fujita-Becker, S., Ruff, C., Meyhofer, E., Soldati, T., Manstein, D. J., Geeves, M. A. and Soldati, D.** (2002). "*Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor." EMBO J **21**(9): 2149-2158.
- Hide, G., Morley, E. K., Hughes, J. M., Gerwash, O., Elmahaishi, M. S., Elmahaishi, K. H., Thomasson, D., Wright, E. A., Williams, R. H., Murphy, R. G. and Smith, J. E.** (2009). "Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*." Parasitology **136**(14): 1877-1885.
- Hill, D. and Dubey, J. P.** (2002). "*Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention." Clin Microbiol Infect **8**(10): 634-640.
- Hippe, D., Gais, A., Gross, U. and Lüder, C. G.** (2009). "Modulation of caspase activation by *Toxoplasma gondii*." Methods Mol Biol **470**: 275-288.
- Hippe, D., Weber, A., Zhou, L., Chang, D. C., Hacker, G. and Lüder, C. G.** (2009). "*Toxoplasma gondii* infection confers resistance against BimS-induced apoptosis by preventing the activation and mitochondrial targeting of pro-apoptotic Bax." J Cell Sci **122**(Pt 19): 3511-3521.
- Honore, S., Couvelard, A., Garin, Y. J., Bedel, C., Henin, D., Darde, M. L. and Derouin, F.** (2000). "[Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients]." Pathol Biol (Paris) **48**(6): 541-547.
- Howe, D. K. and Sibley, L. D.** (1995). "*Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease." J Infect Dis **172**(6): 1561-1566.
- Huston, C. D., Houpt, E. R., Mann, B. J., Hahn, C. S. and Petri, W. A., Jr.** (2000). "Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*." Cell Microbiol **2**(6): 617-625.
- Hutchins, J. B. and Barger, S. W.** (1998). "Why neurons die: cell death in the nervous system." Anat Rec **253**(3): 79-90.
- Hwang, I. Y., Quan, J. H., Ahn, M. H., Ahmed, H. A., Cha, G. H., Shin, D. W. and Lee, Y. H.** (2010). "*Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70." Parasitol Res **107**(6): 1313-1321.
- Jimenez-Ruiz, A., Alzate, J. F., Macleod, E. T., Luder, C. G., Fasel, N. and Hurd, H.** (2010). "Apoptotic markers in protozoan parasites." Parasit Vectors **3**: 104.
- Johnson, M. S., Broady, K. W. and Johnson, A. M.** (1999). "Differential recognition of *Toxoplasma gondii* recombinant nucleoside triphosphate hydrolase isoforms by naturally infected human sera." Int J Parasitol **29**(12): 1893-1905.
- Joiner, K. A., Beckers, C. J., Bermudes, D., Ossorio, P. N., Schwab, J. C. and Dubremetz, J. F.** (1994). "Structure and function of the parasitophorous vacuole membrane surrounding *Toxoplasma gondii*." Ann N Y Acad Sci **730**: 1-6.

- Jones, J. L. and Dubey, J. P.** (2010). "Waterborne toxoplasmosis--recent developments." Exp Parasitol **124**(1): 10-25.
- Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M., McQuillan, G., Navin, T. and McAuley, J. B.** (2001). "*Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors." Am J Epidemiol **154**(4): 357-365.
- Kagan, V. E., Borisenko, G. G., Serinkan, B. F., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Liu, S. X., Shvedova, A. A., Fabisiak, J. P., Uthaisang, W. and Fadeel, B.** (2003). "Appetizing rancidity of apoptotic cells for macrophages: oxidation, externalization, and recognition of phosphatidylserine." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(1): L1-17.
- Keller, P., Schaumburg, F., Fischer, S. F., Hacker, G., Gross, U. and Lüder, C. G.** (2006). "Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation in vitro by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis." FEMS Microbiol Lett **258**(2): 312-319.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.** (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kim, L. and Denkers, E. Y.** (2006). "*Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis." J Cell Sci **119**(Pt 10): 2119-2126.
- Koppe, J. G., Loewer-Sieger, D. H. and de Roever-Bonnet, H.** (1986). "Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis." Lancet **1**(8475): 254-256.
- Kruszon-Moran, D. and McQuillan, G. M.** (2005). "Seroprevalence of six infectious diseases among adults in the United States by race/ethnicity: data from the third national health and nutrition examination survey, 1988--94." Adv Data(352): 1-9.
- Kur, J., Holec-Gasior, L. and Hiszczyńska-Sawicka, E.** (2009). "Current status of toxoplasmosis vaccine development." Expert Rev Vaccines **8**(6): 791-808.
- Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C. and Sibley, L. D.** (1999). "Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **102**(2): 311-324.
- Lang, C., Algner, M., Beinert, N., Gross, U. and Lüder, C. G.** (2006). "Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression." Microbes Infect **8**(8): 1994-2005.
- Lang, C., Gross, U. and Lüder, C. G.** (2007). "Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*." Parasitol Res **100**(2): 191-203.
- Lang, C., Hildebrandt, A., Brand, F., Opitz, L., Dihazi, H. and Lüder, C. G.** (2012). "Impaired Chromatin Remodelling at STAT1-Regulated Promoters Leads to Global Unresponsiveness of *Toxoplasma gondii*-Infected Macrophages to IFN-gamma." PLoS Pathog **8**(1): e1002483.

- Lauber, K., Appel, H. A., Schlosser, S. F., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. and Wesselborg, S.** (2001). "The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis." J Biol Chem **276**(32): 29772-29781.
- Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J. L., Maes, P., Tartar, A., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F.** (1993). "Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane." Mol Biochem Parasitol **59**(1): 143-153.
- Lindholm, D. and Arumae, U.** (2004). "Cell differentiation: reciprocal regulation of Apaf-1 and the inhibitor of apoptosis proteins." J Cell Biol **167**(2): 193-195.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X.** (1997). "DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." Cell **89**(2): 175-184.
- Lüder, C. G. and Gross, U.** (2005). "Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis." Curr Top Microbiol Immunol **289**: 219-237.
- Lüder, C. G., Lang, C., Giraldo-Velasquez, M., Algner, M., Gerdes, J. and Gross, U.** (2003). "*Toxoplasma gondii* inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA." J Neuroimmunol **134**(1-2): 12-24.
- Lüder, C. G., Walter, W., Beuerle, B., Maeurer, M. J. and Gross, U.** (2001). "*Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha." Eur J Immunol **31**(5): 1475-1484.
- Lyons, R. E., McLeod, R. and Roberts, C. W.** (2002). "*Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion." Trends Parasitol **18**(5): 198-201.
- Matoba, K., Shiba, T., Takeuchi, T., Sibley, L. D., Seiki, M., Kikyo, F., Horiuchi, T., Asai, T. and Harada, S.** (2010). "Crystallization and preliminary X-ray structural analysis of nucleoside triphosphate hydrolases from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **66**(Pt 11): 1445-1448.
- Mele, R., Gomez Morales, M. A., Tosini, F. and Pozio, E.** (2004). "Cryptosporidium parvum at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro." Infect Immun **72**(10): 6061-6067.
- Mercier, C., Adjogble, K. D., Daubener, W. and Delauw, M. F.** (2005). "Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?" Int J Parasitol **35**(8): 829-849.
- Messam, C. A. and Pittman, R. N.** (1998). "Asynchrony and commitment to die during apoptosis." Exp Cell Res **238**(2): 389-398.

- Molestina, R. E., Payne, T. M., Coppens, I. and Sinai, A. P.** (2003). "Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane." J Cell Sci **116**(Pt 21): 4359-4371.
- Montoya, J. G. and Liesenfeld, O.** (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-1976.
- Montoya, J. G. and Remington, J. S.** (1996). "Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis." Clin Infect Dis **23**(2): 277-282.
- Montoya, J. G. and Remington, J. S.** (2008). "Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy." Clin Infect Dis **47**(4): 554-566.
- Mordue, D. G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C. A. and Sibley, L. D.** (2001). "Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines." J Immunol **167**(8): 4574-4584.
- Mordue, D. G. and Sibley, L. D.** (1997). "Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry." J Immunol **159**(9): 4452-4459.
- 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.
- Naismith, J. H. and Sprang, S. R.** (1998). "Modularity in the TNF-receptor family." Trends Biochem Sci **23**(2): 74-79.
- Nakaar, V., Beckers, C. J., Polotsky, V. and Joiner, K. A.** (1998). "Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase." Mol Biochem Parasitol **97**(1-2): 209-220.
- Nash, P. B., Purner, M. B., Leon, R. P., Clarke, P., Duke, R. C. and Curiel, T. J.** (1998). "*Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis." J Immunol **160**(4): 1824-1830.
- Nicolle, C. and Manceaux, L. H.** (2009). On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. 1908. Int J Parasitol. **39**: 863-864.
- Nissapatorn, V.** (2009). "Toxoplasmosis in HIV/AIDS: a living legacy." Southeast Asian J Trop Med Public Health **40**(6): 1158-1178.
- Orlofsky, A., Weiss, L. M., Kawachi, N. and Prystowsky, M. B.** (2002). "Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response." J Immunol **168**(4): 1840-1846.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S., Kufe, D. and Kharbanda, S.** (2000). "Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90." EMBO J **19**(16): 4310-4322.

- Pappas, G., Roussos, N. and Falagas, M. E.** (2009). "Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis." Int J Parasitol **39**(12): 1385-1394.
- Payne, T. M., Molestina, R. E. and Sinai, A. P.** (2003). "Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis." J Cell Sci **116**(Pt 21): 4345-4358.
- Pleyer, U., Torun, N. and Liesenfeld, O.** (2007). "[Ocular toxoplasmosis]." Ophthalmologie **104**(7): 603-615, quiz 616.
- Potokar, M., Kreft, M., Chowdhury, H. H., Vardjan, N. and Zorec, R.** (2006). "Subcellular localization of Apaf-1 in apoptotic rat pituitary cells." Am J Physiol Cell Physiol **290**(3): C672-677.
- Radke, J. R. and White, M. W.** (1998). "A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase." Mol Biochem Parasitol **94**(2): 237-247.
- Rathmell, J. C. and Thompson, C. B.** (2002). "Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease." Cell **109** Suppl: S97-107.
- Reubold, T. F., Wohlgemuth, S. and Eschenburg, S.** (2009). "A new model for the transition of APAF-1 from inactive monomer to caspase-activating apoptosome." J Biol Chem **284**(47): 32717-32724.
- Richardson, H. and Kumar, S.** (2002). "Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death." J Immunol Methods **265**(1-2): 21-38.
- Riedl, S. J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R. and Shi, Y.** (2005). "Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP." Nature **434**(7035): 926-933.
- Riedl, S. J. and Salvesen, G. S.** (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 405-413.
- Riedl, S. J. and Shi, Y.** (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.
- Ryning, F. W., McLeod, R., Maddox, J. C., Hunt, S. and Remington, J. S.** (1979). "Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation." Ann Intern Med **90**(1): 47-49.
- Saeij, J. P., Coller, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W. and Boothroyd, J. C.** (2007). "Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue." Nature **445**(7125): 324-327.
- Samraj, A. K., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K. and Schmitz, I.** (2006). "Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis." J Biol Chem **281**(40): 29652-29659.

- Saraste, A. and Pulkki, K.** (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." Cardiovasc Res **45**(3): 528-537.
- Sato, S.** (2011). "The apicomplexan plastid and its evolution." Cell Mol Life Sci **68**(8): 1285-1296.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H. and Peter, M. E.** (1999). "Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells." J Biol Chem **274**(32): 22532-22538.
- Schaumburg, F., Hippe, D., Vutova, P. and Lüder, C. G.** (2006). "Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites." Parasitology **132** Suppl: S69-85.
- Schaumburg, F.** (2007). "Hemmung der Wirtszellapoptose durch *Toxoplasma gondii*: Molekulare Mechanismen der verminderten Cytochrom c-induzierten Caspase-Aktivierung im zellfreien System" Dissertation, Medizinische Fakultät Göttingen
- Sibley, L. D. and Ajioka, J. W.** (2008). "Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps." Annu Rev Microbiol **62**: 329-351.
- Sibley, L. D., Khan, A., Ajioka, J. W. and Rosenthal, B. M.** (2009). "Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1530): 2749-2761.
- Silverman, J. A., Qi, H., Riehl, A., Beckers, C., Nakaar, V. and Joiner, K. A.** (1998). "Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells." J Biol Chem **273**(20): 12352-12359.
- Sinai, A. P. and Joiner, K. A.** (2001). "The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane." J Cell Biol **154**(1): 95-108.
- Sinai, A. P., Payne, T. M., Carmen, J. C., Hardi, L., Watson, S. J. and Molestina, R. E.** (2004). "Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **34**(3): 381-391.
- Sinai, A. P., Webster, P. and Joiner, K. A.** (1997). "Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction." J Cell Sci **110** (Pt 17): 2117-2128.
- Smith, J. E.** (1995). "A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **25**(11): 1301-1309.
- Song, G., Ouyang, G. and Bao, S.** (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J Cell Mol Med **9**(1): 59-71.

Spierings, D., McStay, G., Saleh, M., Bender, C., Chipuk, J., Maurer, U. and Green, D. R. (2005). "Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis." Science **310**(5745): 66-67.

Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. and Alnemri, E. S. (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." Nature **410**(6824): 112-116.

Sullivan, W. J., Jr. and Jeffers, V. (2011). "Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency." FEMS Microbiol Rev.

Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D. and Remington, J. S. (1988). "Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*." Science **240**(4851): 516-518.

Suzuki, Y., Sa, Q., Gehman, M. and Ochiai, E. (2011). "Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain." Expert Rev Mol Med **13**: e31.

Talanian, R. V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M. C., Mankovich, J. A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K. D. and Wong, W. W. (1997). "Substrate specificities of caspase family proteases." J Biol Chem **272**(15): 9677-9682.

Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S. J., Tang, K., Beatty, W. L., Hajj, H. E., Jerome, M., Behnke, M. S., White, M., Wootton, J. C. and Sibley, L. D. (2006). "A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*." Science **314**(5806): 1776-1780.

Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-1316.

Trapani, J. A. (1998). "Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes." Int Rev Cytol **182**: 111-192.

van Engeland, M., Kuijpers, H. J., Ramaekers, F. C., Reutelingsperger, C. P. and Schutte, B. (1997). "Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis." Exp Cell Res **235**(2): 421-430.

Vutova, P., Wirth, M., Hippe, D., Gross, U., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I. and Lüder, C. G. (2007). "*Toxoplasma gondii* inhibits Fas/CD95-triggered cell death by inducing aberrant processing and degradation of caspase 8." Cell Microbiol **9**(6): 1556-1570.

Waller, R. F. and McFadden, G. I. (2005). "The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites." Curr Issues Mol Biol **7**(1): 57-79.

Weiss, L. M. and Kim, K. (2000). "The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*." Front Biosci **5**: D391-405.

Weiss, L. M., Ma, Y. F., Takvorian, P. M., Tanowitz, H. B. and Wittner, M. (1998). "Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response." Infect Immun **66**(7): 3295-3302.

Wong, S. Y. and Remington, J. S. (1993). "Biology of *Toxoplasma gondii*." AIDS **7**(3): 299-316.

Zhou, X. W., Kafsack, B. F., Cole, R. N., Beckett, P., Shen, R. F. and Carruthers, V. B. (2005). "The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins." J Biol Chem **280**(40): 34233-34244.

Zuzarte-Luis, V. and Hurle, J. M. (2005). "Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb." Semin Cell Dev Biol **16**(2): 261-269.