

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. M. Frosch

**Charakterisierung und Lokalisation der *Toxoplasma gondii*
Katalase: Peroxisomen in Apicomplexa?**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Achim J. Kaasch
aus Rottweil

Würzburg, Juli 2002

Referent: Prof. Dr. med M. Frosch
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. H. Moll
Dekan: Prof. Dr. med V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2003

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Toxoplasma</i>	1
1.2	Medizinische Bedeutung von <i>Toxoplasma gondii</i>	4
1.3	Antioxidative Schutzmechanismen von <i>T. gondii</i>	5
1.4	Das Enzym Katalase	6
1.5	Peroxisomen – Morphologie und enzymatische Ausstattung	9
1.6	Peroxisomen – Biogenese und Protein Targeting	10
1.7	Spezialisierte Peroxisomen: Glyoxysomen und Glykosomen	12
2	Ergebnisse	15
2.1	Klonierung und Sequenzierung der <i>Toxoplasma gondii</i> Katalase	15
2.2	Analyse der Sequenz	16
2.3	Western Blot mit Antiserum gegen <i>T. gondii</i> Katalase	25
2.4	Lokalisation in der Immunfluoreszenz	26
2.5	Lokalisation mittels Histochemie	28
2.6	Expression von Katalase in CHO-Zellen	28
2.7	Expression eines Reportergens in CHO-Zellen	29
3	Materialien und Methoden	31
3.1	Bakterienstämme	31
3.2	Parasitenstämme	31
3.3	Lambda-Phagen	31
3.4	Zelllinien	31
3.5	Plasmide	32
3.6	Primäre Antikörper	32
3.7	Sekundäre Antikörper	32
3.8	Kulturbedingungen für Zelllinien	32
3.9	Passagieren der Zelllinien	33
3.10	Passage der Parasiten in der Zellkultur	33
3.11	<i>In vivo</i> Exzision	33
3.12	Praktisches Vorgehen bei der <i>in vivo</i> Excision	35
3.13	„Rapid Amplification of cDNA Ends“ (5' RACE)	35
3.14	Sequenzierung	36
3.15	Herstellung des Antiserums gegen <i>T. gondii</i> Katalase	36
3.16	Antikörper Aufreinigung	38

3.17 Western Blot	38
3.18 Immunfluoreszenz	39
3.19 DAB Präzipitation	40
3.20 Klonierung der Expressions-Konstrukte	40
3.21 Transfektion der CHO-Zellen	40
3.22 Allgemeine molekularbiologische Techniken	41
3.23 Oligonukleotide und Chemikalien	41
3.24 Protein-Modellierung mit Swissmodel	41
3.25 Verwendete Software	43
3.26 Puffer und Lösungen	44
3.27 Benutzte Geräte	45
4 Diskussion	46
5 Zusammenfassung	50
6 Abkürzungsverzeichnis	52

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Toxoplasma*

Der eukaryontische Erreger *Toxoplasma gondii* gehört zu den *Apicomplexa*, einem Phylum der Protozoa. Dieser Gruppe gehören ca. 5000 verschiedene Spezies an, die weitreichende Bedeutung in der Medizin und Biologie besitzen [51]. Weitere wichtige Vertreter der *Apicomplexa* sind *Plasmodium*, *Sarcocystis*, *Babesia*, *Eimeria*, *Perkinsus* und *Theileria*.

Insgesamt zählt *Toxoplasma gondii* zu den am weitesten verbreiteten Krankheitserregern mit einer regional unterschiedlichen Durchseuchungsrate von 40-70%. *Plasmodium* hingegen, der Erreger der Malaria, stellt mit 300-500 Millionen Fällen die weltweit häufigste Infektionskrankheit dar. Die Infektion von Tieren mit *Eimeria*, *Babesia*, *Theileria* und *Perkinsus* führt zu großen Verlusten in der Viehhaltung [19, 27, 89].

Das gemeinsame taxonomische Merkmal der *Apicomplexa* ist der „apikale Komplex“, eine aus mehreren Zellorganellen bestehende Struktur am vorderen Ende der Parasiten, die bei der Invasion der Wirtszelle eine entscheidende Rolle spielt. Der apikale Komplex besteht aus dem Konoid, Rhoptrien und Mikronemen (Abbildung 1). Weitere elektronenmikroskopisch nachweisbare Zellorganellen von *T. gondii* sind der Apikoplast, ein sekundär erworbener Chloroplast [87], ein einzelnes Mitochondrium, der Golgi-Apparat und elektronendichte, sekretorische Granula, die sogenannten „dense granules“ [50]. Der obligat intrazelluläre Einzeller ist ca. 5-6 μm lang, 2-3 μm breit und leicht gekrümmt, was in der Namensgebung berücksichtigt wurde (toxon = Bogen).

Der Lebenszyklus von *Toxoplasma* (Abb. 2) wechselt fakultativ zwischen geschlechtlicher Vermehrung (Gamogonie) im Darmepithel des Endwirts (Katzen) und der ungeschlechtlichen Vermehrung (Schizogonie) in einer Reihe von verschiedenen Zwischenwirten. Im Darmepithel einer infizierten Katze entstehen Oozysten, die mit dem Kot ausgeschieden werden (Abb. 2, 1). In einer Oozyste reifen zwei Sporozysten mit jeweils vier Sporozoiten heran (Abb. 2, 2). Nach oraler Aufnahme durch einen Zwischenwirt, werden die Sporozoiten im Darm freigesetzt und dringen in extraintestinalen Zellen ein. Innerhalb dieser Zellen bildet sich eine Pseudozyste (Vakuole), in der sich die Parasiten ungeschlechtlich vermehren (Abb. 2, 4). Die Teilung findet in einem 6-8 h lang dauerndem Zyklus statt und führt zu Tachyzoiten, die Vakuole rasch anfüllen. Nach einigen Teilungsschritten bricht die Wirtszelle auf und die Tachyzoiten werden freigesetzt.

Über Blut und Lymphe gelangen Tachyzoiten in Hirn- und Muskelgewebe, wo sie sich zu Bradyzoiten, der langsam wachsenden Form, weiterentwickeln können. Bradyzoiten bilden Gewebssysteme, die bis zu mehreren hundert Parasiten enthalten können (Abb. 2, 6). Durch Genuß von rohem Fleisch werden weitere Zwischenwirte infiziert, was

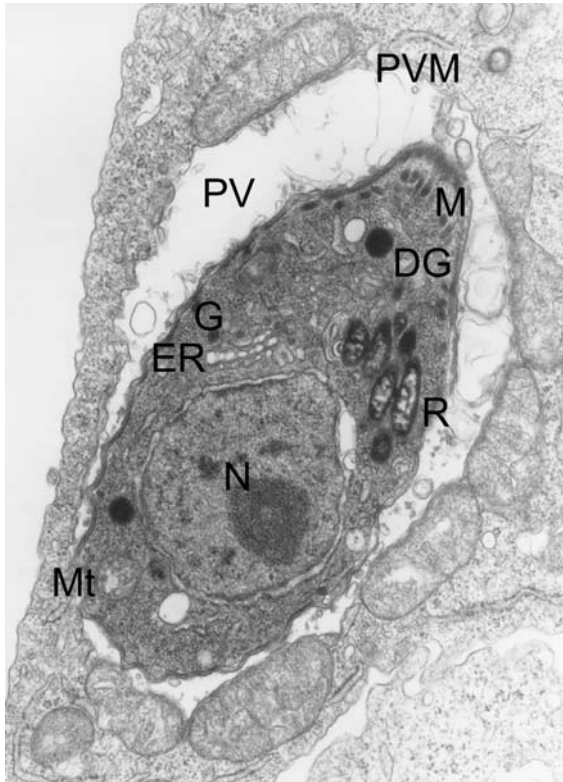


Abbildung 1: **Elektronenmikroskopische Abbildung eines einzelnen Parasiten in einer Wirtszelle.** Parasitäre Vakuole (PV), perivakuoläre Membran (PVM), Rhoptrien (R), Mikronemen (M), Dense Granules (DG), Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi (G), Nukleus (N), Mitochondrium (Mt). Zu beachten sind auch die membranassoziierten Mitochondrien der Wirtszelle (hMt). Nicht zu erkennen ist der Apikoplast.

wiederum zur Entstehung von Tachyzoiten führt (Abb. 2, 8). Eine Infektion des Endwirts kann entweder über die Aufnahme von Oozysten, Pseudozysten oder Gewebszysten erfolgen.

Die Tachyzoiten von *T. gondii* dringen aktiv in die Wirtszellen ein [28]. Dieser Vorgang dauert ca. 20-30 Sekunden. Zuerst dockt der Parasit mit seinem vorderen Ende an der Oberfläche der Wirtszelle an. Dann entsteht die „moving junction“, eine elektronendichte Verbindung zwischen der Parasiten und Wirtszellmembran, die für Membranproteine undurchlässig ist [60]. Durch aktives Eindringen des Parasiten in die Zelle entsteht eine Vakuole, in der *T. gondii* sich vermehren kann.

Bei der Invasion spielt das sekretorische System von *T. gondii* eine entscheidende Rolle [30, 44]. Die Produkte von Mikronemen, Rhoptrien und Granula densa werden sequentiell sezerniert und tragen zur Bildung und Erhaltung der Vakuole bei [29].

Die Exozytose der Mikronemen wird durch Erhöhung des intraparasitären Kalziumspiegels ausgelöst [13]. Die sezernierten Produkte der Mikronemen dienen der Fortbewegung des Parasiten und Erkennung von Oberflächen, indem sie eine Verbindung zwischen dem Parasiten und extrazellulären Oberflächen schaffen [94]. Mit der Exozytose der Rhoptrien beginnt die Einstülpung der Wirtszellmembran und die Bildung der Vakuole. Die Rhoptrien haben einen hohen Cholesterol- und Phospholipid-Gehalt und tragen vermutlich zur Bildung der vakuolären Membran bei. Die aus den Rhoptrien se-

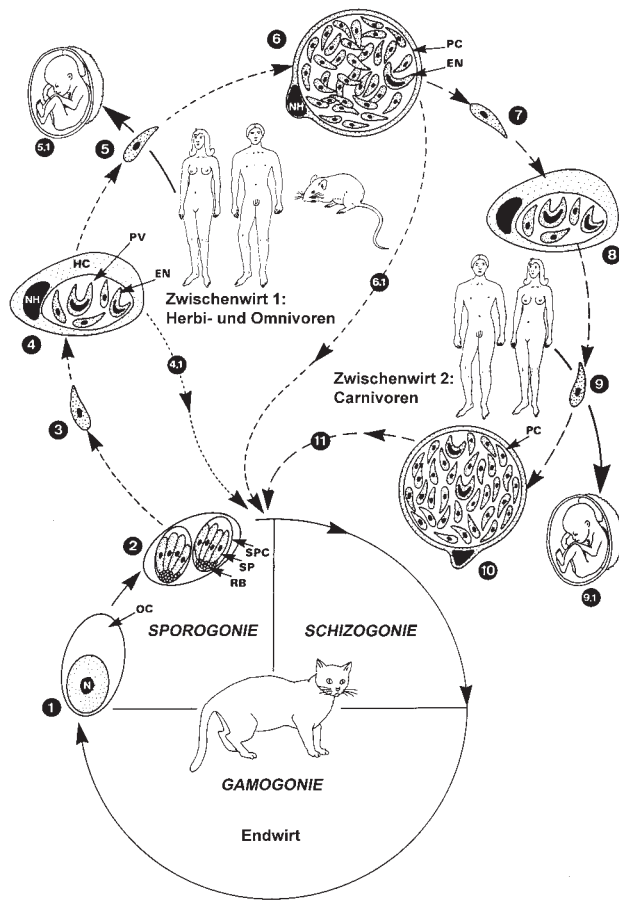


Abbildung 2: **Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii***. Einzelheiten finden sich im Text. Abkürzungen: EN Teilung durch Endodyogenie, HC Wirtszelle, N Nukleus, NH Wirtszellnukleus, OC Oozyste, PC primäre Zystenwand, PV parasitäre Vakuole, RB Residualkörper, SP Sporozoit, SPC Sporozoitenzyste. Übersicht nach Mehlhorn [57].

zernierten Proteine werden entweder in die vakuoläre Membran eingebaut oder liegen in löslicher Form innerhalb der Vakuole vor. Eines dieser Proteine, Rop2, vermittelt die Assoziation von Mitochondrien der Wirtszelle mit der vakuolären Membran über einen neuartigen Mechanismus [98, 99]. Die Sekretion aus den Granula densa trägt zur Ausbildung des tubulovesikulären Netzwerks bei [96]. Dieses Netz besteht aus Membranen, die sich innerhalb der Vakuolenmembran fingerförmig ausstülpen. Eine Funktion dieses Netzwerks ist bisher nicht bekannt.

Innerhalb der Vakuole vermehren sich die Tachyzoiten durch Endodyogenie. Endodyogenie ist eine spezialisierte Form der Zellteilung, bei der zwei Tochterzellen innerhalb der Mutterzelle entstehen. Während der Bildung der Tochterzellen wird die Mutterzelle zerstört [26]. Unter entsprechenden Umweltbedingungen entwickeln sich Bradyzoiten. Bradyzoiten, die langsam wachsende Form von *T. gondii*, liegen in Gewebssystemen vor, die viele hundert Parasiten enthalten können. Trigger für die Bildung von Gewebssystemen *in vitro* sind Stressoren wie Erhöhung des pH-Wertes oder der Temperatur [100]. Der Induktor für die Zystenbildung *in vivo* ist jedoch nicht bekannt.

Andere Organismen, wie *Legionella pneumophila* oder *Mycobacterium ssp.*, haben ver-

schiedene Strategien entwickelt, um dem lysosomalen System des Wirts zu entgehen. Sie beeinflussen entweder die Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen, entkommen aus der Vakuole ins Zytoplasma oder verhindern die Ansäuerung des Phagosoms [97]. *T. gondii* umgeht durch die aktive Invasion das endosomale System der Wirtszelle [42]. Im weiteren Verlauf kommt es zu keiner Fusion des lysosomalen Kompartimentes mit der parasitären Vakuole – die Vakuole bleibt für die Wirtszelle unsichtbar.

Die Nährstoff-Aufnahme von *T. gondii* ist nicht vollständig bekannt. Lösliche Moleküle bis zu einer Größe von 1300 Da, wie z. B. Aminosäuren oder Nukleotide, können über Poren in der Membran in die Vakuole übertreten [90]. Die Aufnahme von Lipiden und Cholesterol, letzteres erhält der Parasit vollständig von der Wirtszelle, ist nicht geklärt [17].

1.2 Medizinische Bedeutung von *Toxoplasma gondii*

In den 1980er Jahren war die Toxoplasma-Enzephalitis häufigste Todesursache bei HIV-Erkrankten. Dies hat sich erst nach Einführung der „highly active anti-retroviral therapy“ (HAART) und der Entwicklung neuer Antibiotika wie Pyrimethamin verändert.

Eine Übertragung auf den Menschen geschieht über Genuß von rohem Fleisch infizierter Tiere, über oozystenhaltigen Katzenkot (z. B. ungewaschener Salat) oder diaplazentar bei einer Erstinfektion während der Schwangerschaft. In der Regel verläuft eine Infektion subklinisch. Gelegentlich treten Lymphknotenschwellungen, Fieber, sowie Kopf- und Muskelschmerzen auf. Unter Immunsuppression, z. B. bei Zytostatika Behandlung oder im Verlauf einer HIV Erkrankung, manifestiert sich die Toxoplasmose als fulminante Enzephalitis mit eventueller septischer Streuung in Herz, Leber und Milz.

Im Rahmen einer Erstinfektion in der Schwangerschaft führt die diaplazentare Übertragung von *T. gondii* Tachyzoiten zur Fetopathia toxoplasmotica. Hierbei kommt es zu Früh- oder Totgeburt, Hepatosplenomegalie, Ikterus, Myokarditis oder einer interstitiellen Pneumonie. Leichtere Fälle gehen mit der typischen enzephalitischen Trias bestehend aus Hydrozephalus, Chorioretinitis und periventrikulären Verkalkungen einher.

Der Nachweis einer frischen Toxoplasma Infektion gelingt serologisch über den Anstieg des IgM-Titers. Dieser kann jedoch bei immunsupprimierten Patienten ausbleiben. Hier kann ein direkter Erregernachweis aus Blut oder Liquor hilfreich sein. Schwangere Frauen sollten prophylaktisch auf das Vorliegen von IgG Antikörpern untersucht werden, und bei Serokonversion einer Therapie zugeführt werden. Therapie der ersten Wahl ist Pyrimethamin kombiniert mit Sulfadiazin oder Clindamycin. Vor der 20. Schwangerschaftswoche wird mit Spiramycin behandelt [38].

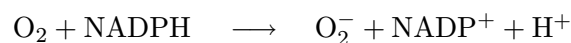
1.3 Antioxidative Schutzmechanismen von *T. gondii*

Die Fähigkeit verschiedener intrazellulärer Parasiten, in Makrophagen zu überleben beruht auf einer Reihe von unterschiedlichen Mechanismen [11, 58]. Generell kann man mindestens vier Strategien abgrenzen: Rückzug des Parasiten in ein sicheres intrazelluläres Kompartiment, Unterdrückung der Produktion antimikrobieller Substanzen und die Modulation der Wirtszelle auf der Ebene der Apoptose [71], der Zytokin-Produktion [6, 12] und der Antigenpräsentation [53]. Auf die Modulation der Immunantwort durch *T. gondii* soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden.

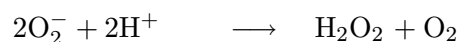
Die Vakuole, in der *T. gondii* sich aufhält, ist ein idealer Schutzort, da sie einerseits innerhalb der Zelle liegt und so vor extrazellulär freigesetzten Substanzen geschützt ist, sowie andererseits keinen Kontakt zum lysosomalen System der Wirtszelle besitzt [14, 97]. Letzteres wird dadurch erklärt, daß *T. gondii* nicht über Phagozytose aufgenommen wird [42, 61] und bei der Invasion alle Wirtszellproteine von der Vakuolenmembran ausgeschlossen werden [60]. Da somit auch die Rezeptoren für die Vesikelfusion (SNARE-Proteine) fehlen, ist die Vakuole für die Wirtszelle als Kompartiment im Membran-Verkehr unsichtbar.

Die wichtigsten antimikrobiellen Substanzen bei der Immunantwort auf eine *T. gondii* Infektion sind freie Radikale [3, 66]. Dazu gehören Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxid-Radikal (O_2^-) und das Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\cdot$). Diese Sauerstoffradikale werden durch Neutrophile und Makrophagen während des „respiratory burst“ freigesetzt und schädigen DNA, Lipide und Proteine [54].

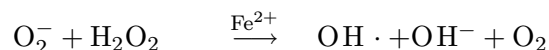
Beim „respiratory burst“ ist der Sauerstoff- und Glukoseverbrauch der Makrophagen exzessiv gesteigert. Der Sauerstoff wird über die NADPH-Oxidase zu O_2^- umgesetzt, während die Glukose über den Hexose-Monophosphat-Shunt das verbrauchte NADPH regeneriert.



Der überwiegende Teil des entstehenden O_2^- reagiert weiter zu H_2O_2 :



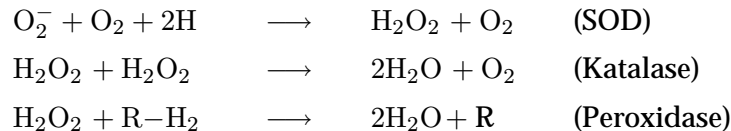
Über die metallkatalysierte Haber-Weiss Reaktion entsteht das Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\cdot$):



Das Hydroxyl-Radikal kann nun Lipide, Proteine, Kohlenhydrate und sogar DNA angreifen und irreversibel schädigen. Besonders Membranlipide können an ihren mehrfach ungesättigten Fettsäuren angegriffen werden, was eine Transformation von *cis* nach

trans und damit eine Formänderung bewirkt. Häufig wird eine Kettenreaktion ausgelöst, die zur Polymerisierung der Fettsäuren führt.

Schutzmechanismen gegen freie Radikale umfassen Antioxidantien (Vitamin E, β -Karotin, Ascorbinsäure und Glutathion) und Enzymsysteme wie Superoxid-Dismutase, Katalase, Peroxidasen und Peroxidoxin. Antioxidantien reagieren mit freien Sauerstoffradikalen und neutralisieren sie. Superoxid-Dismutase (SOD) eliminiert das Superoxid-Radikal (O_2^-). Katalase und Peroxidasen setzen H_2O_2 um.



Peroxidoxine (oder Peroxiredoxine) sind eine relative neu entdeckte Familie antioxidativer Enzyme [56]. Sie können unterschiedliche Peroxide, so auch Wasserstoffperoxid, spalten. Ihre Besonderheit besteht darin, daß sie, im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten antioxidativen Enzymen, keine Metalle im aktiven Zentrum enthalten. Ihr Reaktions-Mechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch spielen redox-aktive Cysteine eine entscheidende Rolle.

Die Toleranz von *T. gondii* gegenüber H_2O_2 ist ungewöhnlich hoch [40, 65–68]. Diese Beobachtung führte schon vor 15 Jahren zum enzymatischen und elektrophoretischen Nachweis von Superoxid-Dismutase und Katalase [69, 95]. Die entsprechenden Gene wurden jedoch erst neuerdings kloniert [23, 45, 74].

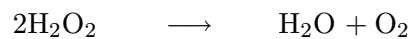
Auf die Existenz des Glutathion-Systems läßt sich anhand einer EST-Sequenz für Glutathion-Reduktase schließen (Genbank Acc. Nr. W00127), die eine Ähnlichkeit von 58 % mit der Glutathion-Reduktase von *Plasmodium falciparum* aufweist. Das *T. gondii* Peroxidoxin wurde ebenfalls beim EST-Projekt identifiziert und nachfolgend kloniert [102]. Ihr Beitrag zum Überleben des Parasiten ist noch nicht geklärt.

1.4 Das Enzym Katalase

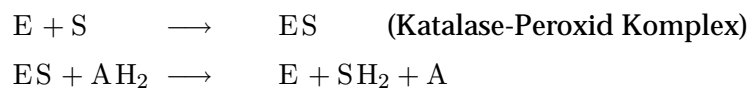
Das Enzym Katalase kommt in fast allen aeroben Lebewesen vor und katalysiert die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Diese Reaktion verhindert die Entstehung von Sauerstoffradikalen und schützt die Zelle vor deren toxischen Wirkung. Ein Beispiel hierfür ist das seltene Krankheitsbild der Akatalasämie (Morbus Katarahara). Dieser autosomal-dominant vererbten Krankheit liegt eine verminderte Katalase-Funktion in den Erythrozyten zugrunde. Sie führt infolge fehlendem Abbaus des von vergrünenden Streptokokken gebildeten Wasserstoffperoxids zu einer Stomatitis ulcerosa [75].

Biochemisch unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Typen der Katalase: Mangan-Katalasen und Häm-Katalasen. Die Mn-Katalasen sind Hexamere, enthalten ein zentrales Mangan-Atom im aktiven Zentrum und kommen nur in Prokaryoten vor [15]. Die Häm-Katalasen hingegen sind ubiquitär verbreitet und haben ein Molekulargewicht von 200-330 kDa. Jede Untereinheit des tetrameren Enzyms enthält ein Häm-Molekül. Dieses besteht aus einem zentralen Eisenatom und Protoporphyrin IX.

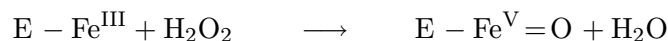
Die klassische katalytische Aktivität der Katalase ist die Spaltung von zwei Molekülen Wasserstoffperoxid:



Zusätzlich zeigt Katalase unter bestimmten Bedingungen eine Peroxidase-Aktivität. Die postulierte Reaktion von Katalase (E), einem kleinen Peroxid als Substrat (S) und einem Wasserstoff-Donator (AH₂) findet folgendermaßen statt:



Die Reaktionskinetik der Katalase ist ungewöhnlich, da bereits geringe Konzentrationen des Substrates H₂O₂ die Aktivität des Enzyms hemmen. Betrachtet man den Reaktionsmechanismus der Zersetzung von H₂O₂ genauer, fallen zwei Teilschritte auf [33]. Zuerst erfolgt eine Oxidation von zwei Elektronen:



Der oxidierte Zustand (Fe^V = O) wird „Compound I“ genannt und entspricht einer oxoferryl-Gruppe mit einem π-Porphyrin Radikal. Der zweite Schritt der Reaktion ist eine zweimalige Reduktion des „Compound I“ durch ein weiteres Molekül H₂O₂:



Bei kontinuierlichem Flux von H₂O₂ wird der „Compound I“ langsam zum „Compound II“ reduziert. Dieser „Compound II“ ist gegenüber H₂O₂ enzymatisch inaktiv. Wird der Zufluß von H₂O₂ jedoch gestoppt, kehrt das Enzym spontan zum Ausgangszustand zurück.

Viele Katalasen enthalten NADPH als Kofaktor, der in der Peripherie des Enzyms fest gebunden ist. Die Oxidation von NADPH zu NADP⁺ verhindert die Inaktivierung des Enzyms durch H₂O₂ und beschleunigt die Reaktion [39, 46]. Ein Modell für den Reaktionsmechanismus [33], der diesen Eigenschaften Rechenschaft trägt ist in Abb. 3 dargestellt.

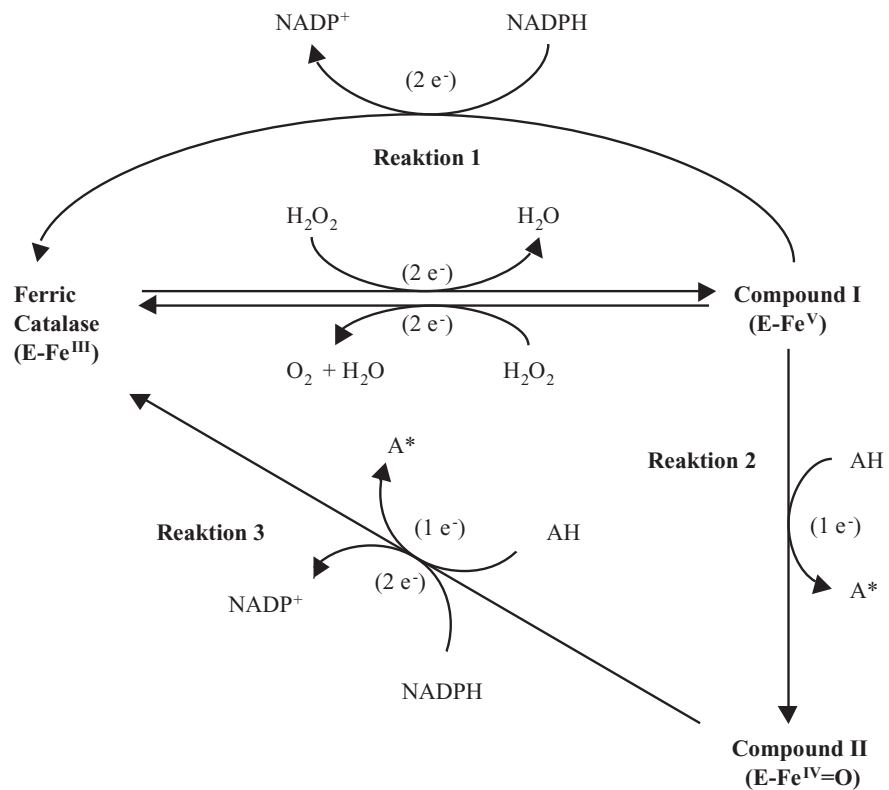


Abbildung 3: **Möglicher Reaktionsmechanismus der Katalase bei konstantem Substratfluss.** **Reaktion 1:** Compound I oxidiert das gebundene NADPH zu $NADP^+$. **Reaktion 2:** Nach Oxidation des NADPH wird Compound I durch einen endogenen oder hinzukommenden Elektronendonator (AH) zu Compound II reduziert. **Reaktion 3:** Der inaktive Compound II wird durch spontane Reduktion oder durch Zugabe von NADPH in den Ausgangszustand (Ferric Catalase) zurückversetzt.

Die Katalase war eines der ersten Enzyme, das aufgereinigt und kristallisiert werden konnte [104]. Die Kristallstruktur der bovinen Katalase wurde zuerst 1981 mit einer Auflösung von 2.5 Å erstellt [70, 85]. Zur Zeit sind 24 Kristallstrukturen von 7 verschiedenen Organismen in der Entrez-Structure Datenbank (National Institute of Health, Bethesda) verzeichnet. Da die Aminosäuresequenz des Proteins über die Arten hinweg hinreichend konserviert ist, können modellbildende Algorithmen (z. B. Swissmodel) zu einer relativ präzisen Strukturvorhersage benutzt werden.

1.5 Peroxisomen – Morphologie und enzymatische Ausstattung

Die Peroxisomen sind subzelluläre Organellen, die erstmals im Jahre 1954 von Rhodin elektronenmikroskopisch im proximalen Tubulus der Mäuseniere als „Microbodies“ beschrieben wurden [86]. In der nachfolgenden Dekade zeigte de Duve durch biochemische und morphologische Studien, daß Katalase, Urat-Oxidase und D-Aminosäuren-Oxidase in einem eigenständigen subzellulären Kompartiment vorliegen, das den Microbodies entspricht [5, 18]. Dieses Kompartiment wurde Peroxisom genannt, um auf das biochemische Zusammenspiel zwischen H_2O_2 -bildenden Oxidasen und Katalase hinzuweisen (Abbildung 4). In den darauf folgenden Jahren wurden Peroxisomen in fast allen eukaryontischen Zellen nachgewiesen (mit Ausnahme der Trichomonaden).

Morphologisch sind Peroxisomen durch eine fein granulierte Matrix und eine sie umgebende einfache Membran gekennzeichnet. In einigen Spezies enthält die Matrix kristalline Strukturen. Die Membran enthält ca. 1,2 nm große Poren, die für Moleküle bis 800 Da durchlässig sind. Häufig sind Peroxisomen rund oder oval, in manchen Zelltypen können sie allerdings auch miteinander verbunden sein oder in anderen komplexen Formationen vorliegen [117]. Der Durchmesser runder Peroxisomen liegt abhängig vom Zelltyp zwischen 100-500 nm. In den Leberzellen der Ratte sind sie mit einem Volumenanteil von 1,5 % vertreten [114]. Innerhalb einer Zelle sind die Peroxisomen in der Regel gleichmäßig verteilt, es wird jedoch eine Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER)

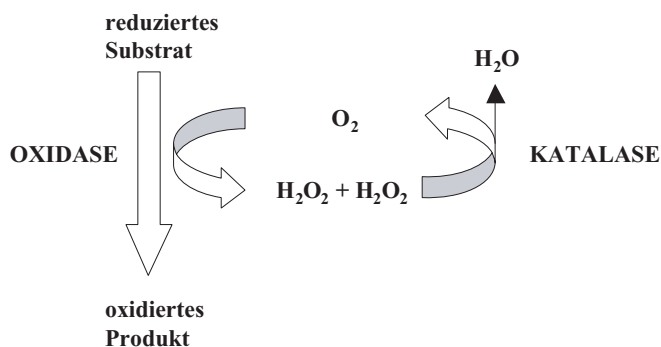


Abbildung 4: **Prinzip der peroxisomalen Oxidation.** Substrate der peroxisomalen Oxidasen werden unter Bildung von H_2O_2 oxidiert. H_2O_2 wird anschließend durch Katalase enzymatisch in O_2 und H_2O gespalten. Das Ineinandergreifen dieser Reaktionen verhindert die Entstehung von toxischen Sauerstoff-Radikalen.

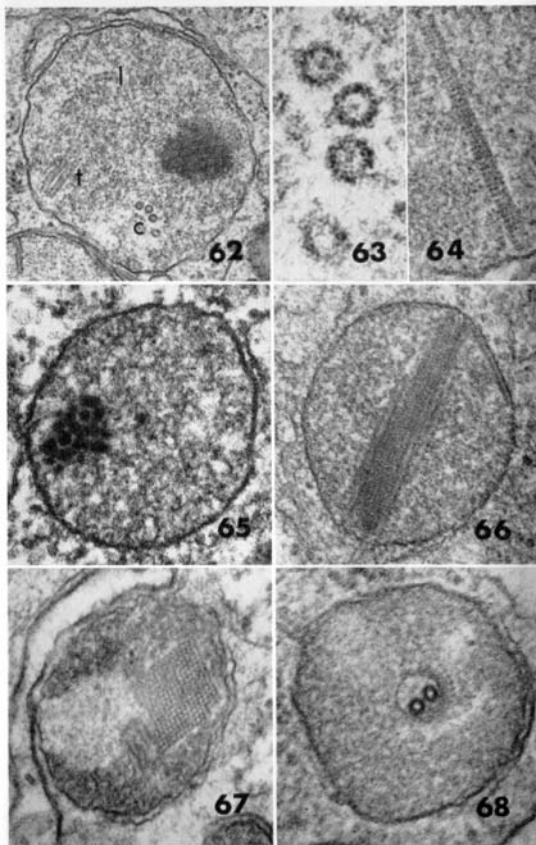


Abbildung 5: **Peroxisomen verschiedener Vogelarten.** Peroxisomen sind sehr polymorphe Zellorganellen. Häufig finden sich kristalline Einschlüsse (64, 66, 67), die bei Vögeln zum Teil als tubuläre Strukturen auftreten (62). Eine Assoziation mit dem ER (67) und Marginalplatten (66, rechts oben) treten auch auf. (Abbildung aus [10]).

gelegentlich beschrieben (Abb. 5).

Die enzymatische Ausstattung der Peroxisomen variiert sehr stark zwischen verschiedenen Zelltypen. Insgesamt sind etwa 50 verschiedene Reaktionen beschrieben worden. Interessanterweise haben die meisten peroxisomalen Enzyme Gegenstücke in anderen Zellkompartimenten, die gleiche oder ähnliche Reaktionen katalysieren, jedoch ohne das toxische Nebenprodukt H_2O_2 zu bilden. Eine Auswahl von biochemischen Reaktionen, die in Peroxisomen zu finden sind, sind in Tabelle 1 dargestellt [84].

1.6 Peroxisomen – Biogenese und Protein Targeting

Die Entstehung von Peroxisomen wird noch kontrovers diskutiert [103]. Nach dem von Lazarow und Fujiki postulierten Modell entstehen neue Peroxisomen nicht *de novo*, sondern nur durch Teilung oder Abspaltung von bestehenden Peroxisomen [49]. Dieses Modell begründet sich aus der Beobachtung, daß Matrix- und Membranproteine der Peroxisomen im Zytosol synthetisiert werden und dann posttranslational in die Organellen transportiert werden. Daraus leitet sich eine Interaktion zwischen Import-Signalen auf dem importierten Protein und Rezeptoren auf der peroxisomalen Oberfläche, sowie die

Oxidation	Synthese	Metabolismus
kurz- und langkettige Fettsäuren Prostaglandine Xenobiotika Spermidin und Spermin Harnsäure D-Aminosäuren Ethanol, Methanol Nitrit Isozitrat	Cholesterol Dolichol Glycerolipide langkettige Fettsäuren Gallensäuren	Wasserstoffperoxid freie Radikale Epoxide Alanin Glyoxylat L-Aminosäuren Purine Polyamine Eicosanoide

Tabelle 1: Biochemische Stoffwechselfvorgänge in den Peroxisomen.

Existenz einer Import-Maschinerie ab. Zwei dieser „peroxisomal targeting signals“ (PTS1 und PTS2) konnten bisher für Matrix-Proteine definiert und die dazu korrespondierenden Rezeptoren (Pex5p und Pex7p) isoliert werden [34, 77, 105].

Das PTS1 wurde zuerst am Luciferase-Genprodukt der Glühwürmchen entdeckt. Es ist ein aus drei Aminosäuren bestehendes Signal am C-Terminus des Proteins mit folgender Konsensus-Sequenz: (S/T/A/G/C/N) - (R/K/H) - (L/I/V/M/A/F/I)¹. Nicht alle dieser Kombinationen sind jedoch Import-Signale und auch die Region unmittelbar vor dem Signal hat einen noch nicht vollkommen geklärten Einfluß auf die Effizienz des Imports [63, 64, 82].

Das PTS2-Signal liegt am N-terminus und hat die Konsensus-Sequenz (X)₂-(R/K)-(L/V/I)-(Q)-(X)₅-(H/Q)-(L/A). Ein Beispiel ist das Importmotiv der peroxisomale Thiolase von *Saccharomyces cerevisiae* mit der Sequenz XXRLQX₅HL [77, 105]. Die bisher bekannten Interaktionen von PTS1 und PTS2 mit den Import-Proteinen ist in Abb. 6 dargestellt.

Targeting-Signale, die die Membran-Proteine in die peroxisomale Membranen einbauen (mPTS1), konnten bisher noch nicht exakt definiert werden. Unter anderem wurde im PEX3-Genprodukt von *Pichia pastoris* eine 40 Aminosäuren lange, N-terminale Sequenz [116] und ein 20 Aminosäuren langer Abschnitt im PMP47-Genprodukt von *Candida boidini* identifiziert [31]. Beide Sequenzen enthalten fünf basische Aminosäuren hintereinander, die von teilweise konservierten Regionen flankiert werden. Ein Konsensus Motiv läßt sich aus der bisherigen Datenlage allerdings nicht ableiten.

In den letzten Jahren jedoch gab es Hinweise, daß das ER eine wichtige Rolle in der Biogenese der Peroxisomen spielt [48, 111]. Nach dem Modell von Titorenko und Rachubinski gelangen einige Membran-Proteine (Pex2p und Pex16p) vom ER, wo sie glyko-

¹PROSITE, Swiss Institute of Bioinformatics

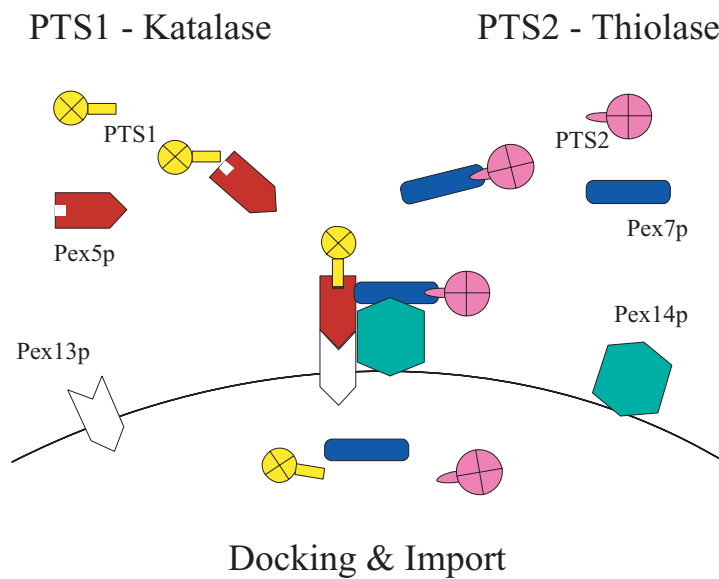


Abbildung 6: **Importsignale für Matrixproteine.** Der post-translationale Proteinimport in die Peroxisomen wird über zwei verschiedene peroxisomale Targeting-Signale (PTS) vermittelt. Das C-terminale PTS1 (z. B. Katalase) interagiert mit seinem Rezeptor Pex5p, das N-terminale PTS2 (z. B. Thiolase) mit Pex7p. Es bildet sich ein Protein-Komplex mit Pex13p und Pex14p, der in das Organell transportiert wird.

syliert werden, mittels kleiner sekretorischer Vesikel [109] zu den Peroxisomen (Abb. 7) [110]. Hierbei entstehen zwei verschiedene transiente Kompartimente (PV1 und PV2), die Katalase bzw. Thiolase enthalten und somit die beiden Importwege (PTS1 und PTS2) widerspiegeln. Durch die Verschmelzung von PV1 und PV2 mit wachsenden Peroxisomen werden die Proteine in der peroxisomalen Membran integriert. Der Vesikeltransport zwischen ER und Peroxisomen basiert auf Interaktionen der beteiligten Membranen mit den Coatomeren COPI und COPII und wird von ARF reguliert [79].

1.7 Spezialisierte Peroxisomen: Glyoxysomen und Glykosomen

Die unterschiedlichen Anforderungen an die metabolischen Leistungen hat spezialisierte Peroxisomen in verschiedenen Tier- und Pflanzenzellen hervorgebracht. Prominenteste Beispiele sind die Glyoxysomen der Pflanzenzellen und die Glykosomen der *Kinetoplastidae*.

Die Glyoxysomen sind der Ort des Glyoxylat-Zyklus. Bei diesem bisher nur in Pflanzen nachgewiesenen Zyklus wird Acetat zu Succinat umgewandelt, was im weitesten Sinne einem Umbau von Fettsäuren zu Zuckern entspricht. Die beiden Hauptenzyme des Glyoxylat-Zyklus, Isozitat-Lyase und Malat-Synthase, konnten bisher nicht sicher in *Toxoplasma gondii* nachgewiesen werden. Glyoxysomen unterliegen einer hohen Wandelbarkeit. Sie können während ihres Lebenszyklus unterschiedliche Enzyme enthalten und sich von Glyoxysomen zu Blatt-Peroxisomen und wieder zurück verwandeln [37].

Eine weitere wichtige Gruppe der spezialisierten Peroxisomen sind die Glykosomen der parasitären Protozoen der Ordnung *Kinetoplastida*, zu der unter anderem *Trypanosoma*

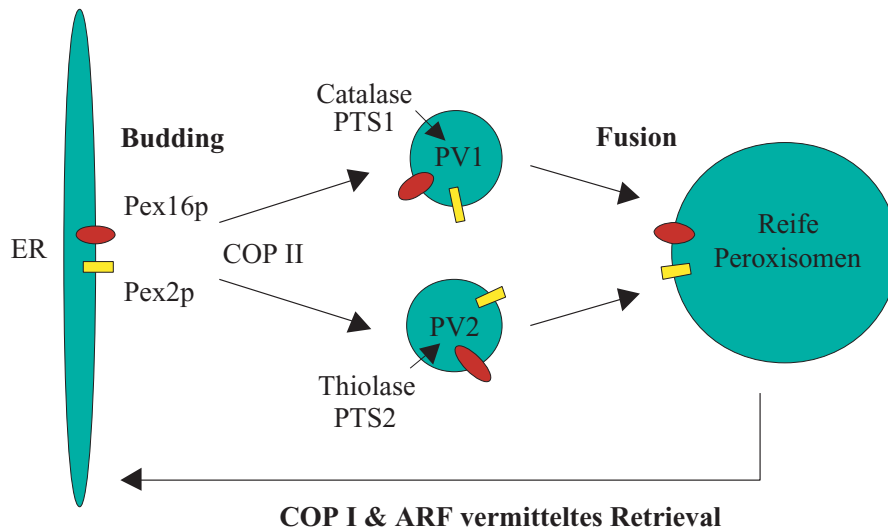


Abbildung 7: **Biogenese von Peroxisomen.** Das Modell von Titorenko und Rachubinski postuliert die Entstehung des peroxisomalen Kompartimentes aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und verknüpft die zwei Importwege für Matrixproteine (PTS1 und PTS2) mit zwei verschiedenen vesikulären Kompartimenten (PV1 und PV2), die unreifen peroxisomalen Kompartimenten entsprechen. Vesikel, die Pex2p und Pex16p als Membranproteine enthalten, spalten sich vom ER ab und werden mit peroxisomalen Matrixproteinen beladen. Die Kompartimente PV1 und PV2 verschmelzen mit schon bestehenden peroxisomalen Vesikeln und bilden reife Peroxisomen.

und *Leishmania* gehören. In den Glykosomen sind Enzyme der Glykolyse kompartimentalisiert [108]. Es wird spekuliert daß dadurch die biochemischen Reaktionen effizienter ablaufen [76].

Die Glykolyse ist für Kinetoplastida von Bedeutung, wenn sie sich im Blut des Wirtsorganismus aufhalten, da dort hohe Glukosespiegel einen Abbau zu Pyruvat fördern. Im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung ist die Energiegewinnung bei der Glykolyse geringer, was nach dieser Hypothese durch eine Kompartimentalisierung ausgeglichen wird. Befindet sich der Parasit wieder im Insektenvektor, werden glykosomale Enzyme vermindert exprimiert und die ATP-Erzeugung auf oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien umgestellt.

Neuere Arbeiten haben allerdings die Sichtweise verschoben [59]. Bakker *et al.* konnten anhand einer Computermodellierung zeigen, daß die Kompartimentalisierung keineswegs den Substratflux erhöht [4]. Durch virtuelle Entfernung der glykosomalen Membran in ihrem Modell entstand eine Akkumulation von Hexose-6-Phosphaten im Zytosol, die vermutlich zu einem osmotischen Schaden führt. Blattner *et al.* demonstrierten, daß Expression von Phosphoglycerat-Kinase im Zytosol zum Tod der amastigoten Parasiten führt [8].

Die Biogenese der Glykosomen ähnelt, soweit untersucht, der Biogenese der Peroxisomen [78, 101]. Bei einigen glykosomalen Enzymen konnte gezeigt werden, daß auch

hier PTS1-Signale als Import-Signale wirken. Der zugehörige Rezeptor wurde kloniert [20]. Jedoch sind die Sequenzen, die PTS1-abhängigen Import bewirken, nicht so stringent, wie in den bisher untersuchten Systemen. So gibt es PTS1-Sequenzen, die Import in Glykosomen bewirken, nicht jedoch in Peroxisomen der Säugetiere [9]. Die Analyse der Kristallstruktur der *Trypanosoma brucei* Aldolase läßt vermuten, daß hier ein PTS2 vermittelter Import in die Glykosomen vorliegt [16].

2 Ergebnisse

2.1 Klonierung und Sequenzierung der *Toxoplasma gondii* Katalase

Die Existenz von Katalase in *Toxoplasma gondii* wurde vor knapp fünfzehn Jahren enzymatisch und elektrophoretisch nachgewiesen [95]. Weitere Schritte zur Charakterisierung dieses Enzyms sind jedoch nie unternommen worden. Dies veranlaßte uns, gezielt nach Katalase Sequenzen in der „expressed sequence tag“ (EST) Datenbank für das *Toxoplasma gondii* Genom² zu suchen [1, 113]. Dort sind zwei Sequenzen verzeichnet (W63499 und W99737), die Ähnlichkeit mit Katalasen anderer Species aufweisen.

Aus den beiden λ -Phagen Klonen der EST Datenbank wurde das Insert, das die *T. gondii* spezifische Sequenz trägt, mit einem Helferphagen (VCSM13) *in vivo* exzidiert und sequenziert. Ausgehend von dieser Sequenz wurde mittels „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (5'RACE) weitere 300 Basenpaare gewonnen. Da jedoch keine größeren Fragmente kloniert werden konnten, wurde mittels „nested“ reverser Transkriptase PCR (RT-PCR) mit einem degenerierten Primer (Fdeg) und drei spezifischen Primern (R3, R4, R5) weitere 700 Basenpaare kloniert und sequenziert. Durch eine weitere 5'RACE konnten weitere Basenpaare über das Startcodon hinaus bestimmt werden. Die Basenabfolge der Katalase wurde mittels Sequenzierung vier unabhängiger Klone eines per RT-PCR (F4, R0) gewonnenes Fragmentes von 2480 bp bestätigt. Die zur Klonierung verwendeten Methoden sind in Abb. 8 dargestellt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in einer Tabelle in Materialien und Methoden auf S. 42 zusammengefaßt.

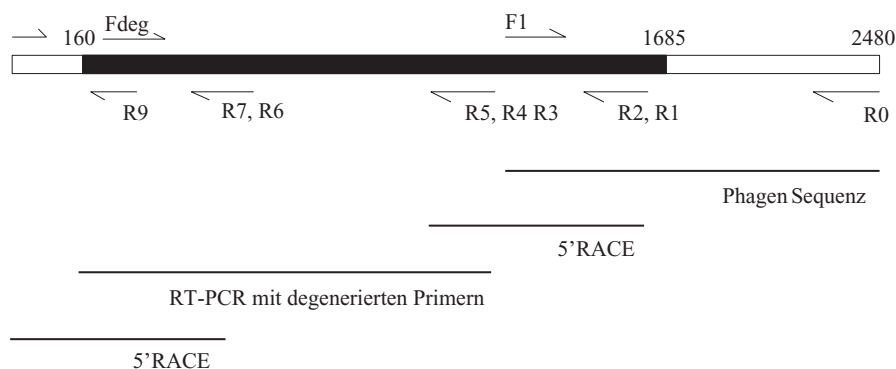


Abbildung 8: **Methoden zur Klonierung der *T. gondii* Katalase.** *T. gondii* Katalase wurde mit Hilfe von verschiedenen Techniken kloniert. Die Balken zeigen an, welche Methode für welchen Abschnitt der Sequenz verwendet wurde. Die 5' und 3' UTRs (untranslated regions) sind weiß, die kodierende Region schwarz dargestellt. Die Pfeile geben die Position der Primer an.

²<http://www.cbil.upenn.edu/ParaDBs/Toxoplasma>

2.2 Analyse der Sequenz

Die vollständige DNA Sequenz ist in Abb. 9 dargestellt. Die cDNA kodiert für ein 502 Aminosäuren langes Protein mit einem molekularen Gewicht von 57,2 kDa. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen eukaryotischen Katalasen zeigt starke Homologien (Tabelle 2), während die DNA Sequenz eine vergleichsweise geringe Ähnlichkeit mit anderen Katalasen aufweist. Ein Alignment von Katalasen verschiedener Species mit der *T. gondii* Katalase ist in Abb. 10 gezeigt.

Eine weitergehende Analyse der Aminosäuresequenz bestätigt, daß es sich in der Tat um Katalase handelt. Beide Katalase Konsensus-Sequenzen³ sind vorhanden: Die Signatur des aktiven Zentrums (As 53-69) und die proximale Häm-Bindungsstelle (As 343-351).

	Konsensus Sequenz	<i>T. gondii</i> Sequenz
Proximale Häm Bindungsstelle	R-[LIVMFSTAN]-F-[GASTNP]-Y-x-D-[AST]-[QEH]	RMFSYIDTH
Signatur des aktiven Zentrums	[IF]-x-[RH]-x(4)-[EQ]-R-x(2)-H-x(2)-[GAS]-[GASTF]-[GAST]	FDRERIPERVVHAKGGG

Dreidimensionale Modelle eines Proteins können aus der Aminosäuresequenz durch Vergleich mit bekannten Strukturen verwandter Proteine errechnet werden. Diese Strukturvorhersagen sind erstaunlich präzise [36,80,81]. Mit Hilfe geeigneter Software erfolgte eine dreidimensionale Modellierung der *T. gondii* Katalase. Als Modellvorlage dienten bekannte Strukturen der bovinen Katalase. Die folgenden Stereobilder können durch leichtes Einwärtsschieln betrachtet werden. (Näheres zur Modellierung in Materialien und Methoden).

Die Homologie zwischen der bovinen Katalase und der *T. gondii* Katalase beträgt 63 %, was für eine 3D-Modellierung gut geeignet ist. Die geringe Abweichung der Koh-

³PROSITE, Swiss Institute of Bioinformatics

Organismus	GenBank Nr.	Identische As.	Positive As.	Wahrscheinlichkeit
<i>B. taurus</i>	S49452	63 %	75 %	10 ⁻¹⁷⁰
<i>H. sapiens</i>	P04040	61 %	74 %	10 ⁻¹⁶⁸
<i>C. elegans</i>	690941A	57 %	72 %	10 ⁻¹⁵³
<i>P. mirabilis</i>	P42321	53 %	69 %	10 ⁻¹⁴¹
<i>S. cerevisiae</i>	115709	49 %	65 %	10 ⁻¹²⁴

Tabelle 2: Ergebnisse eines Alignments mittels PSI-Blast [2] von Katalasen fünf ausgewählter Organismen.

GTG CCG CTC CTC GAA GGA CTG AGT GAA ACG CTG AGG TGC GCG TCT CGT GAA GGC CAC TGT 60
TGC TTG TCC TCA CGG TGA AGG TCG GCC AGC CAG CTT TTG ACG GTA CCG AGA TTC TTC TGT 120
TTT TGA CCC CGA AGG GAA ACG TGC CCG TCA CCG AAA ATG ACT CAG GTT CCG CCC GTA 180
M T Q V P P V
ACA TTC CAG CAG TAT GGA CCG GTT ATC ACG ACC TCT GCT GGG AAC CCA GTC GAT GAC AAC 240
T F Q Q Y G P V I T T S A G N P V D D N
CAA AAC TCG GTA ACT GCT GGA CCC TAC GGC CCC GCG ATC CTG AGT AAC TTC CAT CTC ATC 300
Q N S V T A G P Y G P A I L S N F H L I
GAC AAG CTG GCC CAC TTC GAT CGA GAA CGC ATT CCC GAG CGC GTT GTG CAT GCC AAG GGC 360
D K L A H F D R E R I P E R V V H A K G
GGT GGC GCC TTT GGC TAT TTC GAG GTC ACT CAT GAC ATC ACC AGA TTC TGC AAA GCG AAG 420
G G A F G Y F E V T H D I T R F C K A K
CTG TTC GAG AAA ATC GGA AAG CGG ACG CCT GTG TTT GCA CGT TTT TCG ACG GTG GCT GGC 480
L Y E K I G K R T P V F A R F S T V A G
GAG TCG GGG AGT GCG GAC ACC AGG CGC GAC CCG CGC GGC TTC GCA CTC AAG TTC TAC ACG 540
E S G S A D T R R R G G F A L K F Y T
GAG GAG GGG AAC TGG GAC ATG GTT GGA AAC AAC ACT CCT ATC TTT TTC GTT CGA GAC GCC 600
E E G N W D M V G N N T P I F F V R D A
ATA AAG TTC CCC GAC TTC ATT CAT ACG CAG AAG CGC CAT CCG CAA ACG CAC CTC CAC GAC 660
I K F P D F I H T Q K R H P Q T H L H D
CCG AAC ATG GTG TGG GAT TTC TTC TCG CTC GTT CCG GAA AGT GTG CAT CAA GTG ACC TTC 720
P N M V W D F F S L V P E S V H Q V T F
CTG TAC ACG GAC CGT GGC ACA CCG GAC GGC TTC CGC CAT ATG AAT GGC TAC GGG AGT CAC 780
L Y T D R G T P D G F R H M N G Y G S H
ACG TTC AAA TTC ATC AAC AAA GAC AAC GAA GCC TTT TAT GTC AAG TGG CAC TTC AAG ACA 840
T F K F I N K D N E A F Y V K W H F T
AAC CAA GGA ATC AAG AAC CTG AAC AGA CAG CGC GCA AAA GAA CTC GAG AGC GAA GAT CCT 900
N Q G I K N L N R Q R A K E L E S E D P
GAC TAC GCG GTT CGT GAC CTG TTC AAC GCC ATT GCC AAG CGA GAG TTT CCC TCT TGG ACC 960
D Y A V R D L F N A I A K R E F P S W T
TTC TGT ATT CAG GTA ATG CCC TTG AAA GAT GCA GAG ACG TAC AAA TGG AAT GTC TTT GAC 1020
F C I Q V M P L K D A E T Y K W N V F D
GTG ACC AAA GTG TGG CCG CAC GGA GAC TAC CCA CTC ATC CCG GTC GGA AAA CTC GTG CTG 1080
V T K V W P H G D Y P L I P V G K L V L
GAT CGC AAC CCA GAA AAC TAT TTC CAA GAC GTG GAA CAA GCA GCT TTT GCG CCA GCT CAT 1140
D R N P E N Y F T Q D V E Q A A F A H
ATG GTG CCA GGG ATT GAA CCG AGC GAA GAT CGC ATG CTG CAG GGA CGC ATG TTC TCC TAC 1200
M V P G I E P S E D R M L Q G R M F S Y
ATC GAC ACT CAT CGG CAC AGA CTT GGC GCC AAT TAC CAT CAG ATT CCT GTG AAC CGC CCG 1260
I D T H R H R L G A N Y H C I P V N R P
TGG AAC GCC CGT GGG GGC GAC TAC TCC GTC CGC GAT GGT CCA ATG TGC GTC GAC GGG AAC 1320
W N A R G G D Y S V R D G P M C V D G N
AAA GGG TCT CAG CTG AAT TAC GAA CCG AAC AGT GTG GAC GGC TTT CCA AAG GAA GAC AGA 1380
K G S Q L N Y E P N S V D G F P K E D R
AAT GCT GCT GTG TCG GGA ACG ACC ACA GTG AGT GGC ACG GTC GCG TGC CAT CCT CAA GAG 1440
N A A V S T T V T G T A C G H P Q E
CAC CCC AAC AGT GAC TTT GAG CAG CCA GGG AAC TTT TAT AGG ACG GTC TTG AGT GAG CCG 1500
H P N S D F E Q P G N F Y R T V L S E P
GAG AGG GAA GCG CTC ATT GGC AAC ATC GCC GAC CAT CTC AGG CAG GCG AGA CGA GAT ATT 1560
E R E A L I G N I A E H L R Q A R R D I
CAA GAG CGA CAG GTG AAG ATT TTT TAC AAG TGC GAT CCA GAG TAT GGC GAG CGC GTC GCT 1620
Q E R Q V K I F Y K C D P E Y G E R V A
CGA GCC ATC GGT TTG CCG ACT GCG GCG TGC TAC CCA GCC AAG ATG TAG GCG TGC GTT GTC 1680
R A I G L P T A A C Y P A K M *
CCG CTT GAG CCA GAA GAC CAA CAA TAG AGG GAC TAA ATA TGC GCA AGG AAG GAA GAC AGG 1760
ACC CTT TCG AAG ACG GAA AAC ACG CAG TCT GAA TTC TTG GCG CTG AGG GGA CCA ACG GGT 1820
TCG TCG CCT TGT GTG ACA ACG ACG AGT AAA AAG ACA AAG CGA ACA GCG ATG ACC GTA GCG 1880
TTC GTC CAC CTG CGT AAA TGT GGC TTA TCT CTG TCA CGA TGC GCA CAA GCG TTT GGT CAT 1940
CGC GTA ATT ACA GAT AGT TGT GTA GTG ACT TGC TGC TGT TGC GTC TTC CAA CAC TTG TAG 2000
TTA GAG AAA TGC ATG TGT ATG GGT AAG CTT GCA TGA ACT GCT ACA TAT CCA TGG TAA ACC 2060
AAT TTG ACT GCA GGT GTC GGC GTT TAC GAC GTC AGT TTC ACA TTC TTG TTC TTG ATT TCC 2120
TTC TTG CAA TCA CTT GCA CTC TGG CAA TTT TTG GAA GGG AAA GGA AAT GTG AGG GTG GGA 2180
GGG CTC AGC ATC CTC TTC CAG TGG TCC TGC CGT TTC CAG TTT GCG CCT AAA GGT AGA GAT 2240
CGC GGG GGG GGT CTC AGG AAT CTA TCC GCG TTT TTT CTC AAA GGA TTT GCA TTT ACT GTT 2300
TCT GAA AGG TGA AAG ACC GGG TGT ATG TGC ACC CAC CTG AGC CAA CCC AGC ATT TCG TAA 2360
TTC CAT CTG CAG CGT GTT TCC CCC TTT TCA AAG CCG ACC TTT TGT GAG AAA ACG TTC CCG 2420
CGG GAA CAG CAC TTT CTG AAC GAG AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA 2480

Abbildung 9: cDNA Sequenz der *T. gondii* Katalase. Die komplette cDNA Sequenz der *T. gondii* Katalase ist in der „Genbank“-Datenbank unter der Zugriffsnummer AF136344 gespeichert. Die unterstrichenen Basenpaare entsprechen der Position der zur Klonierung verwendeten Primer.

```

T.gondii      1      10      20      30      40
H.sapiens    MADSRDPASDQMQHWKEQRAA.KAD.L.G.G.KL.VI.V.R.LLVQDVVFT.E
C.elegans    MPNDPSDNQLKTYKET--YPKPQ...N.A.IYSKTAVL...RR..MLMQDVVYM.E
S.cerevisae  MSKLGQEKNEVNSDVREDR.V.N.T.N.INEPFVTQRI.EH..LL.QDYN...S

T.gondii      50      60      70      80      90      100
H.sapiens    LAHFDuRRERIPERVVHAKGGGAFGYFEVTHDITRFCKAKLFEKIGKRTVPVFARFSTVAGES
C.elegans    M.....A.....KYS..V..H...K..IAV.....
S.cerevisae M.....A.H.....SKY...DI.N.V..Q..LLI.....G...
# ># : # : / ++
- --- : /

T.gondii      110     120     130     140     150     160
H.sapiens    GSADTRRDPRGFALKFYTEEGNWDNVGNNTPIFFVRDAIKFPDFIHTQKRHPQTHLHDPN
C.elegans    ...V...V...D...L...I...P.L.S...S...N...K..D
S.cerevisae ...A...I...L...I...P.H..N...N...K...
++ # / \ \ ++ + ++ ++

T.gondii      170     180     190     200     210     220
H.sapiens    MVWDFFSVLVPE---SVHQVTFLYTDRGTPDGFRRHMNGYGSHTFKFKINKDNEAFYVKKWHFK
C.elegans    ...W..R...L...S..FS..I..H.....LV.ANG..V.C.F.Y.
S.cerevisae .IF..WLR...-AL...M..FS..L...Y.....MV...GK.I..F.F.
o + \+ o o o \ < o \

T.gondii      230     240     250     260     270     280
H.sapiens    TNQGIKLNLRQRAKELESEDPDYAVRDLFNIAIAKREFPSPWTFCIQVMPLKDAETYKWNV
C.elegans    .D...SVED.AR.SQ...GI...TGKY...FY...TFNQ...FPF.P.
S.cerevisae .PT..V...TVEK.GQ.A.S...SI...E.GD..V.KMF...TFEQ..KWEF.P.
.D...TIEE.TKIAGSN...CQQ...E..QNGNY...VY...T.TER..KKLPFS..

T.gondii      290     300     310     320     330     340
H.sapiens    DVTKVWPHGDYPLIPVGKLVLDuRNPENYFQDVEQAAFAPAHMVPuGIuEPSuEDRMLQGRMFS
C.elegans    .L.....K.....N..V...AE...I..D.SN.P...A.P.K...L.A
S.cerevisae .....E...M..N..R...AE...S..C...I...F.P.K...I..
L...Q.QF..RR...I..NE..L.F.AQ.....STT..YQ.A.A.PV..A.L..
\o\o # < #

T.gondii      350     360     370     380     390     400
H.sapiens    YIDuTHRRLGANYHQIPVNRPNWARGGDYSVRDGMuCVDGNKGSQuLNuYEPNSVDGFPKED
C.elegans    .P.....P..LH...C.YR..VAN.Q-...MOD.Q.GA...Y...FG--AP.Q
S.cerevisae .T..F...P..I.L...C.YRS.AHNTQ-...A.AY-D.QQHA..FF...FN--YGKT
.A.A.Y...P.F.....C.YASKFFNPuAI.....N.N..F..E.T.LA.DKSYTYIQQ
# - : /

T.gondii      410     420     430     440     450     460
H.sapiens    RNAAVSGTTTVSGTVACHPQuEHP--NSDFEQPGNFYRTVLSEuP-EREALIGNIAEHLRQA
C.elegans    QPS.LEHSIQY..E.RRFNTAND--D-NVT.VRA..VN..N.E-Q.KR.CE...G..KD.
S.cerevisae .PDVuKDT.FPAT.D.DRYESGDD--NuYD..RQ.WEK..DTG-A..RMCQ.F.GP.GEC
DRPIQQHQEVWN.PAIPYHWATSPGDV..V.AR.L..VLGKQ.GQuKN.AY..GI.VEG.
o \ o \ \

T.gondii      470     480     490     500
H.sapiens    RRDIQERQVKIFYKCDPEYGERVARAIGLPTAACYPuAKM
C.elegans    QIF..KKA..N.TEVH.D..SHIQALLDKYNAEKPKNAIHTFVQSGSHLAAREKANL
S.cerevisae HDF.IKGMIDH.S.VH.DF.A..KALIQKQARSHI
CPQ..Q.VYDM.ARV.KGLS.AIKKVAEAKHASELSSNSKuF

```

Abbildung 10: Sequenzvergleich verschiedener Katalasen. Katalasen der folgenden Spezies sind in einem Alignment dargestellt: *T. gondii* (GenBank Zugriffsnummer AF136344), *H. sapiens* (NCB Zugriffsnummer 179950), *C. elegans* (NCB Zugriffsnummer 1078837) und *S. cerevisiae* (NCB Zugriffsnummer 115709). Punkte zeigen an, daß die As. mit denen der *T. gondii* Katalase identisch sind, wohingegen ein Bindestrich eine Lücke anzeigt. Die Symbole unter dem Alignment weisen auf mögliche Funktionen der As. hin: Distale Häm Bindungsstelle ">", Proximale Häm Bindungsstelle "<"; Bindung der Propionat-Seitenketten des Häm ":"; As. in der Nähe des aktiven Zentrums "#"; Bindungspartner des NADPH "o"; As., die am katalytischen Mechanismus teilnehmen "/"; Säurereste in der Umgebung des NADPH "\"; As. des Substrat-Kanals "+"; As., die mit den anderen Homomeren interagieren "-". PTS-Signale sind fett gedruckt. Die Signatur des Aktiven Zentrums (aa 53-69) und die Proximale Häm-Bindungs-Signatur (aa 343-351) sind unterstrichen. Das Alignment wurde mittels ClustalW1.73 durchgeführt [107].

Funktion	Aminosäuren
Aktives Zentrum	distale Hämbindungspartner: F142, F150, F53 proximale Hämbindungspartner: H207, R343 Interaktion mit Propionatgruppe: H207, R343
Umgebung des aktiven Zentrums	Y347, D54, H64, V135, F323, S346A und L50M
Katalytischer Mechanismus	H64, N137, S103, Y347
NADPH Bindungsstelle	R192, T190, N202, H294, H183, Q435, W292, H224, V443
Umgebung des NADPH	E448, F187, T139, P140, Y204, K226, Q271, P293, V291, F439, L444, T190S und E448Q
Substratkanal	V105, A106, D117, P118, F142, F143, F150, F153, I154, V185, L188, Q157, und K158
Tetramerinteraktion	L50, D54, F53, D349 und R55
PTS1	A500, K501, M502

Tabelle 3: Funktionell relevante Aminosäurereste der *T. gondii* Katalase.

lenstoffgerüste in der Übereinanderprojektion dieser Katalasen in Abb. 11 unterstreicht dies.

Die Anordnung der Sekundärstrukturen weist einige Besonderheiten auf (Abb. 13). Acht antiparallele β -Faltblätter schirmen die Hämgruppe auf einer Seite ab. Die andere Seite des Häms ist frei zugänglich und bildet den Substratkanal (s. u.). Die NADPH- und die Hämgruppe befinden sich in relativer Nähe, was ein Zusammenwirken beim katalytischen Mechanismus wahrscheinlich macht. Dabei soll NADPH die Rolle des Elektronendonators übernehmen und die Bildung des inaktiven „Compound II“ rückgängig machen [7]. Der lange „wrapping loop“, der keiner eindeutigen Sekundärstruktur zugeordnet werden kann, ist auf der rechten Seite zu sehen. Er dient der Interaktion mit den benachbarten Monomeren [43]. Der C-Terminus ist in dieser Abbildung oben links als α -Helix zu sehen. Er bildet das peroxisomale Targeting-Signal. Da Katalase erst nach der Proteinfaltung und Zusammenbau des Tetramers in die Peroxisomen transportiert wird [112], ist seine exponierte Lage nachvollziehbar.

Die Darstellung der Oberfläche eines Katalase Monomers in Abb. 12 zeigt, wie kompakt die Katalase in ihrem Kernbereich gefaltet ist. In der oberen Mitte ist ein Teil des NADPH-Moleküls zu sehen, das von der Oberfläche zugänglich ist.

Ein Vergleich der *T. gondii* Katalase Sequenz mit anderen Katalasen zeigt, daß nicht nur die Sekundärstrukturen ähnlich sind. Aminosäuren mit entscheidenden Funktionen sind hoch konserviert. Eine Übersicht über diese Aminosäuren bietet Tabelle 3.

Aminosäurereste der *T. gondii* Katalase, die das aktive Zentrum bilden, sind identisch mit den entsprechenden Aminosäuren der humanen Katalase. Alle weiteren Aminosäu-

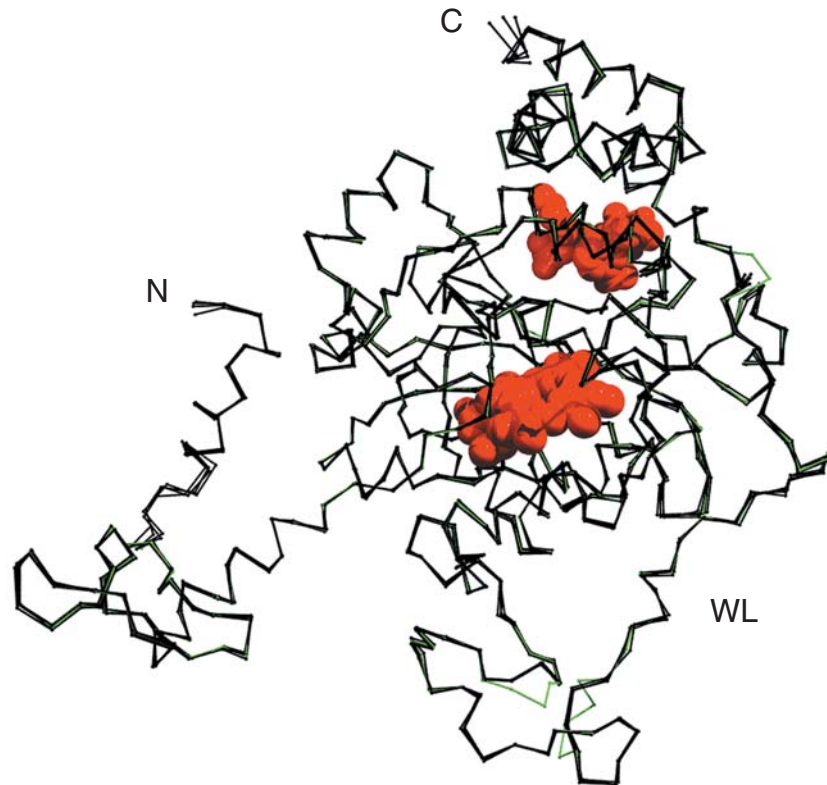


Abbildung 11: **Projektion des Kohlenstoffrückgrats verschiedener Katalasen.** Das Kohlenstoffrückgrat der *T. gondii* Katalase (grün) wurde auf die Modellvorlagen der verschiedenen Untereinheiten der bovinen Katalase projiziert. Beachtenswert ist die geringe Abweichung im zentralen Bereich des Proteins. Der N- und C-Terminus sind entsprechend bezeichnet. WL: „wrapping loop“ rot: Häm und NADPH.

ren aus der Umgebung des aktiven Zentrums sind ebenfalls konserviert, mit Ausnahme geringer Abweichungen (S346A und L50M) [33]. Weiterhin sind Aminosäuren konserviert, die im katalytischen Mechanismus eine Rolle spielen [52]. Drei der Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums (L50, F53, D54) gehören zum benachbarten Monomer. Die sterischen Verhältnisse im aktiven Zentrum sind in Abb. 14 dargestellt.

Einige Katalasen, wie z. B. humane und bovine Katalase, binden NADPH als Cofaktor. NADPH soll dabei unter anderem die Bildung des „Compound II“, ein inaktiver Zustand im katalytischen Zyklus, verhindern [39, 46]. Konservierte Aminosäuren lassen darauf schließen, daß *T. gondii* Katalase auch NADPH binden kann (Abb. 15). Die Säurereste der möglichen NADPH-Bindungsstelle und deren Umgebung sind identisch mit jenen der humanen Katalase mit Ausnahme von T190S und E448Q [33].

Das Substrat H_2O_2 diffundiert zum aktiven Zentrum der Katalase durch einen circa 30 Å langen Kanal (Abb. 16) [33]. Aminosäuren, die vermutlich die Wände dieses Kanals bilden, sind identisch mit der humanen Sequenz. Dies weist darauf hin, daß die Band-

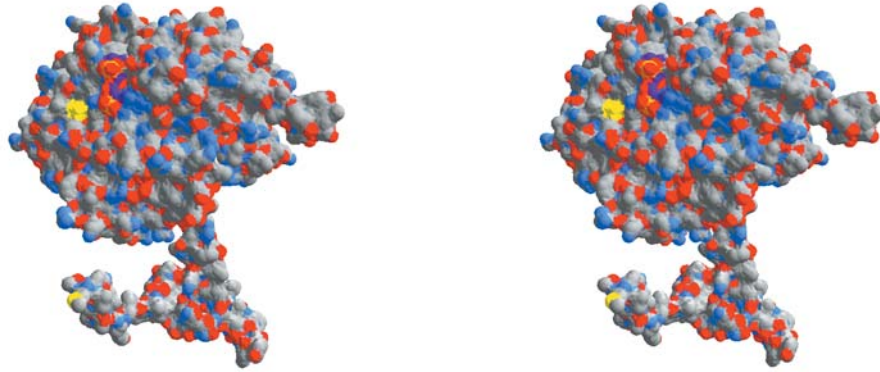


Abbildung 12: **Oberflächen-Modell der *T. gondii* Katalase.** Dieses Modell zeigt die errechnete Oberflächenstruktur der *T. gondii* Katalase. *grau*: Kohlenstoff; *blau*: Stickstoff; *rot*: Sauerstoff.



Abbildung 13: **α -Helices und β -Faltblattstrukturen der *T. gondii* Katalase.** Ein β -Barrel aus acht antiparallelen β -Faltblättern schirmt die Häm-Gruppe zur einen Seite ab. Die Häm und NADPH Bindungsstellen sind in relativer Nähe. Der lange „wrapping loop“ auf der rechten Seite interagiert mit den benachbarten Monomeren. Am exponierten C-Terminus befindet sich das peroxisomale Targeting-Signal. *rot*: α -Helices; *grün/blau*: β -Faltblattstrukturen; *grau*: coils; *gelb*: NADPH und Häm.

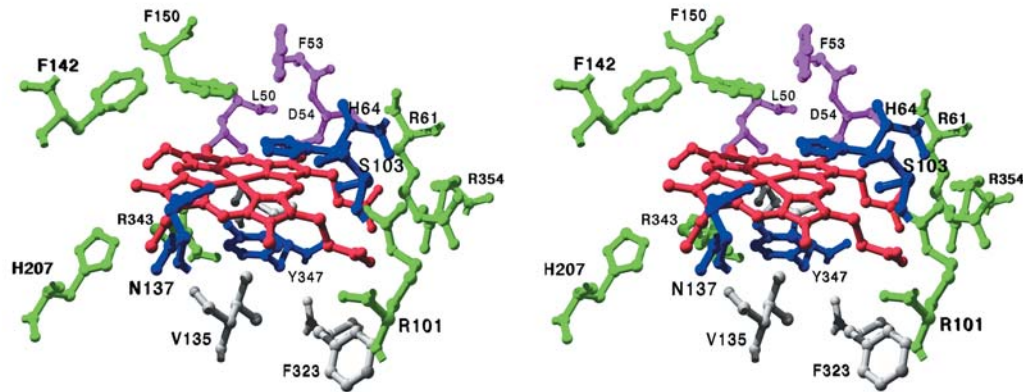


Abbildung 14: **Aktives Zentrum der *T. gondii* Katalase.** *rot*: Häm; *pink*: Aminosäuren des benachbarten Monomers; *blau*: Aminosäuren, die am katalytischen Mechanismus teilnehmen; *grün*: Bindungspartner des Häm; *grau*: weitere Aminosäuren aus der Umgebung des Häm.

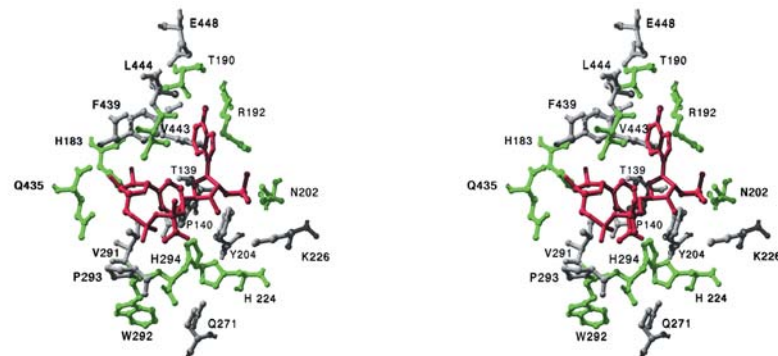


Abbildung 15: **Aminosäuren aus der Umgebung der NADPH-Bindungsstelle der *T. gondii* Katalase.** *rot*: NADPH; *grün*: NADPH-Bindungspartner; *grau*: Nähere Umgebung des NADPH.

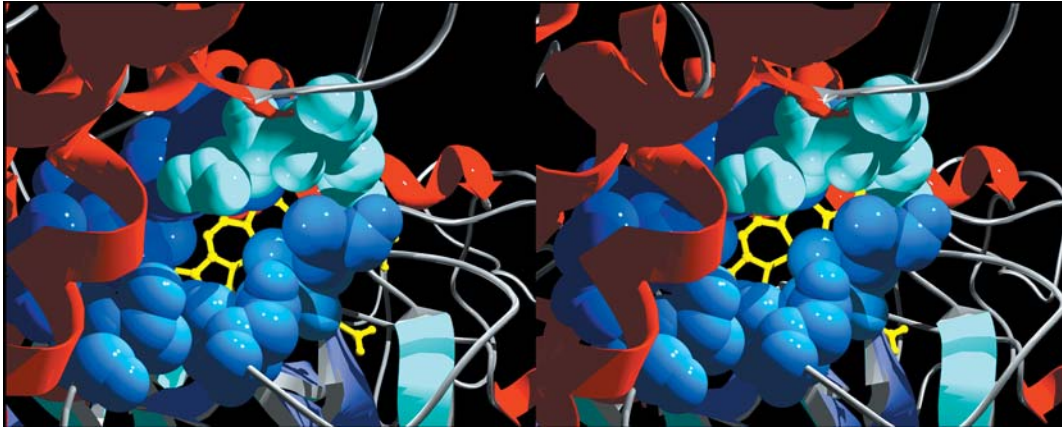


Abbildung 16: **Substrat-Kanal der *T. gondii* Katalase.** Aminosäuren, die den Substratkanal bilden, der von der Oberfläche des Proteins zum Häm (*gelb*) führt sind hier im Kugelmodell dargestellt (*blau*). α -Helices und β -Faltblätter sind analog zu Abb. 13 dargestellt.

breite möglicher Substrate ähnlich ist [118].

Die meisten Katalasen sind Homotetramere, mit Ausnahme der prokaryontischen Mangan-Katalasen. Aminosäuren, die in *Proteus mirabilis* Katalase Interaktionen zwischen den einzelnen Monomeren vermitteln, sind identisch mit den entsprechenden Säureresten der *T. gondii* Katalase (L50, D54, F53, D349 und R55). Humane und bovine Katalase haben zusätzlich einen längeren C-terminus, der die gegenseitige Bindung der einzelnen Monomere stabilisiert [33]. In Abb. 17 sind die vier Untereinheiten unterschiedlich eingefärbt, um die Lage der einzelnen Monomere zueinander deutlich zu machen.

Weiterhin besitzt *T. gondii* Katalase ein peroxisomales Targeting Signal (PTS1) am C-Terminus. Die letzten drei Aminosäuren (-AKM) stimmen mit dem Konsensusmotiv für peroxisomale Targeting Signale (PTS) der Klasse 1 überein. Experimentell wurde bereits in Affennierenzellen (CV1) gezeigt, daß -AKM als PTS1 wirken kann, wenn es an Chloramphenicol-Acetyltransferase gekoppelt ist [106]. Die exponierte Lage des PTS1 in der 3D-Struktur ist Vorbedingung für den peroxisomalen Transport.

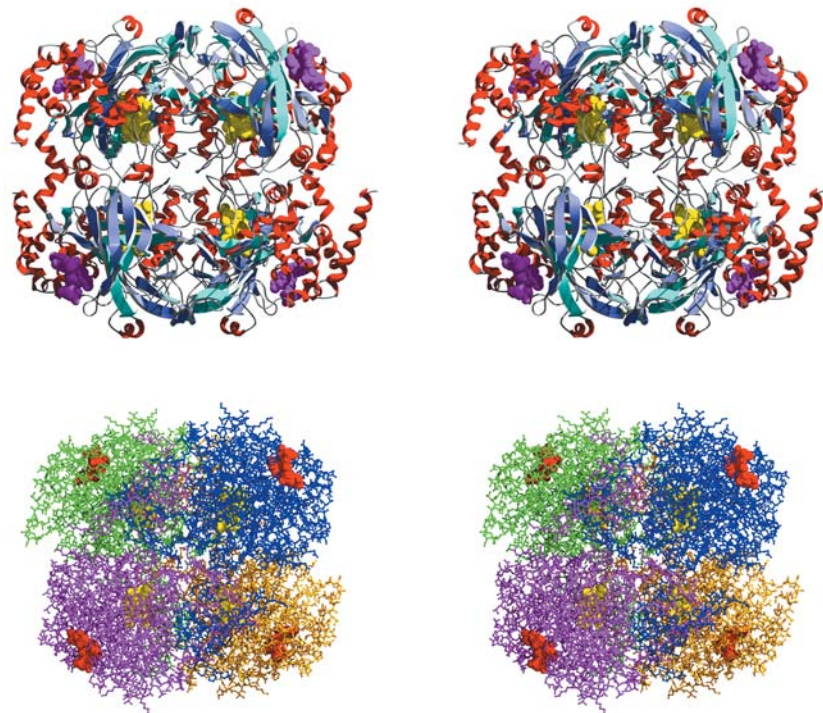


Abbildung 17: *T. gondii* Katalase als Homotetramer. Unten: Die vier Monomere sind in den Farben *grün*, *blau*, *pink* und *orange* dargestellt, die Häm-Gruppe in *gelb*, das NADPH in *rot*. Oben: Die Lage der einzelnen Monomere zueinander wird durch Betrachtung der Sekundärstrukturelemente deutlich.

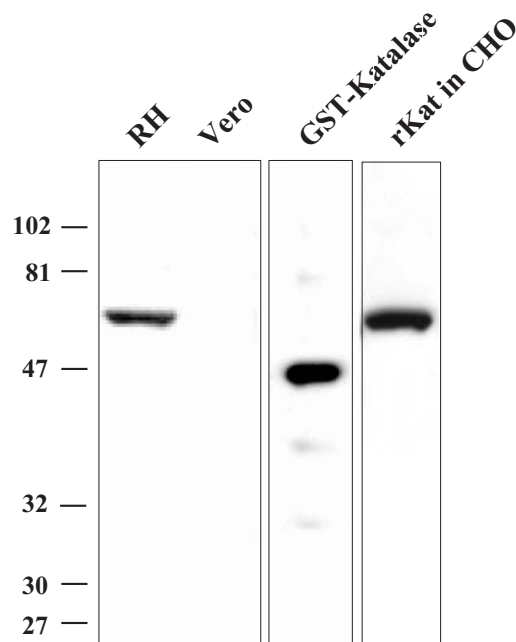


Abbildung 18: **Western Blot mit Antiserum gegen ein *T. gondii*-Katalase-GST Fusionsprotein.** Das Antiserum gegen die *T. gondii* Katalase reagiert mit den Parasitenlysate (Spur 1), das aus einer Vero-Zellkultur stammt. Die negative Kontrolle mit einer nicht-infizierten Vero-Zellkultur (Spur 2) zeigt keine Reaktion. Als positive Kontrolle fungiert das GST-Katalase Fusionsprotein (Spur 3) und die in CHO-Zellen exprimierte rekombinante *T. gondii*-Katalase.

2.3 Western Blot mit Antiserum gegen *T. gondii* Katalase

Für die Produktion eines Antiserums wurde ein Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase (GST) von *Schistosoma mansoni* mit den Aminosäuren 335-502 der *T. gondii* Katalase hergestellt (Molekulargewicht: 47 kDa). Diese Region der Katalase wurde als Antigen gewählt, da sie die größten Unterschiede gegenüber der humanen Katalase Sequenz aufweist. Die Herstellung und Testung des Antiserums ist im Kapitel Materialien und Methoden genauer beschrieben.

Wie erwartet, reagiert das Antiserum mit dem rekombinanten GST-Katalase Fusionsprotein, das bei 47 kDa läuft (Abb. 18, Spur 3). Eine einzelne Bande bei 63 kDa erkennt das Antiserum im Lysat ganzer Parasiten (Abb. 18, Spur 1). Die Größe dieses Proteins ist im Einklang mit der vorhergesagten Größe von *T. gondii* Katalase (57,2 kDa). Zudem läuft es in derselben Höhe wie rekombinante in CHO-Zellen exprimierte *T. gondii* Katalase (Abb. 18, Spur 4). Kein Signal gibt es im Lysat der unveränderten Wirtszellen (Abb. 18, Spur 2) und bei Inkubation mit prä-Immuns-Serum (nicht dargestellt). Somit reagiert das Antiserum mit einem 63 kDa *T. gondii* Protein, das wahrscheinlich der Katalase entspricht.

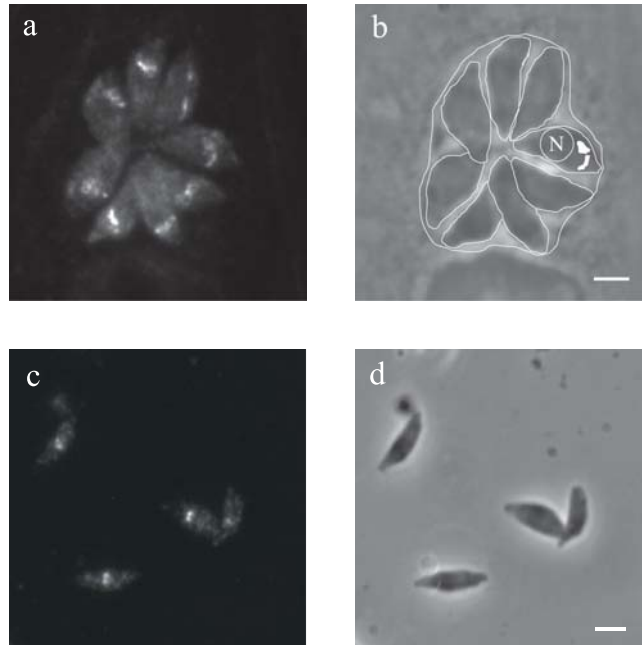


Abbildung 19: **Immunfluoreszenz der *T. gondii* Katalase.** Dargestellt ist ein Immunfluoreszenz-Assay mit einem aufgereinigten Antikörper gegen die *T. gondii* Katalase an intra- und extrazellulären Parasiten. *a*: Intrazelluläre Parasiten replizieren sich in der Wirtszelle und bilden dabei eine Rosette in der Vakuole. Das anteriore Ende der Parasiten zeigt nach außen. *b*: Eine Schemazeichnung der Parasiten in der Vakuole verdeutlicht deren Position in der Phasenkontrastdarstellung. In einem Parasiten wurde zusätzlich der Nukleus (N) und die Katalase enthaltenden Strukturen dargestellt. *c* und *d*: In extrazellulären Parasiten erscheint das Signal kompakter als in intrazellulären Parasiten, was möglicherweise jedoch ein Fixationsartefakt ist. *Skalierung* 2 μm .

2.4 Lokalisation in der Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz markiert das anti-GST-Katalase Antiserum vesikuläre Strukturen im vorderen Ende des Parasiten (Abb. 19). Zusätzlich besteht ein diffuses Signal im Inneren des Parasiten. Dieses Signal ist spezifisch für Katalase, da es verschwindet, wenn das Antiserum zuerst mit rekombinanten Protein inkubiert wird. Vermutlich entspricht diese diffuse Verteilung einem Pool von Katalase im Zytoplasma des Parasiten. Der Immunfluoreszenz-Assay mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen die Glutathion-S-Transferase ergibt kein Signal in *T. gondii*.

Werden zwei verschiedene Antikörper bei der Immunfluoreszenz verwendet, kann eine Kolo-kalisation von Katalase mit bisher bekannten Zellorganellen ausgeschlossen werden. In Abb. 20 überlappt das Signal für Katalase (grün) mit keiner der Zellorganellen (Rhoptrien, Mikronemen, Granula densa und den Apikoplasten). Daraus lässt sich schließen, daß Katalase in einem eigenständigen Kompartiment innerhalb von *Toxoplasma gondii* vorkommt.

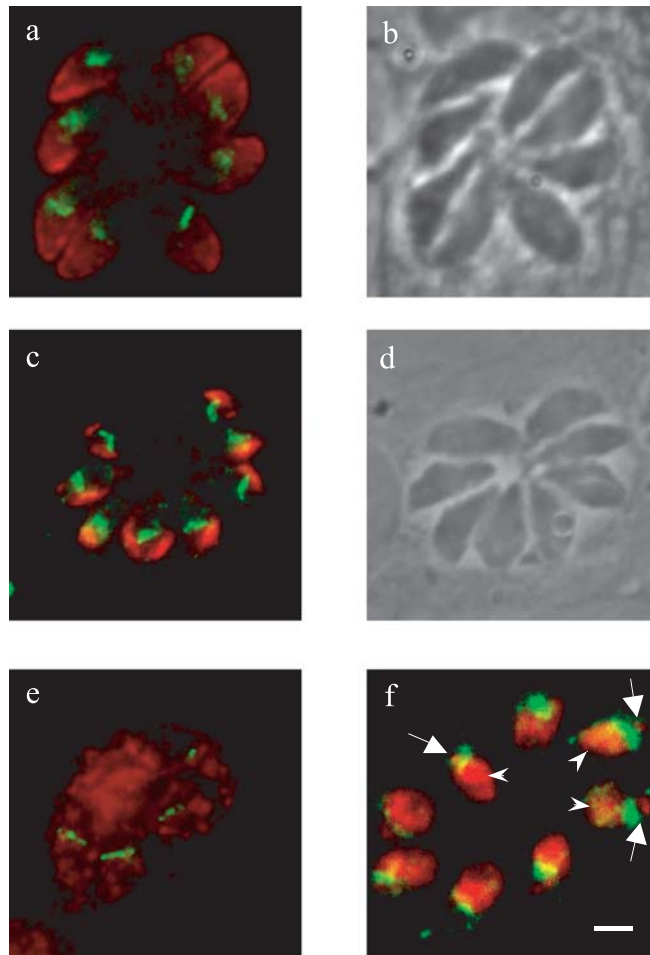


Abbildung 20: **Kolokalisation der *T. gondii* Katalase mit verschiedenen subzellulären Organellen.** Katalase (in grün) kolokalisiert nicht mit den bekannten subzellulären Kompartimenten von *T. gondii*. Mikronemen (a), Rhoptrien (c) und Dense granules (e) (hier rot dargestellt) wurden mit monoklonalen Antikörpern markiert. Die entsprechenden Phasenkontrastbilder sind in (b) und (d) gezeigt. Die Anfarbung der Apikoplast DNA (f, Pfeile) wurde mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol erreicht. Die Pfeilspitzen in (f) zeigen auf die Nuklei der Parasiten. Skalierung 2 μm .

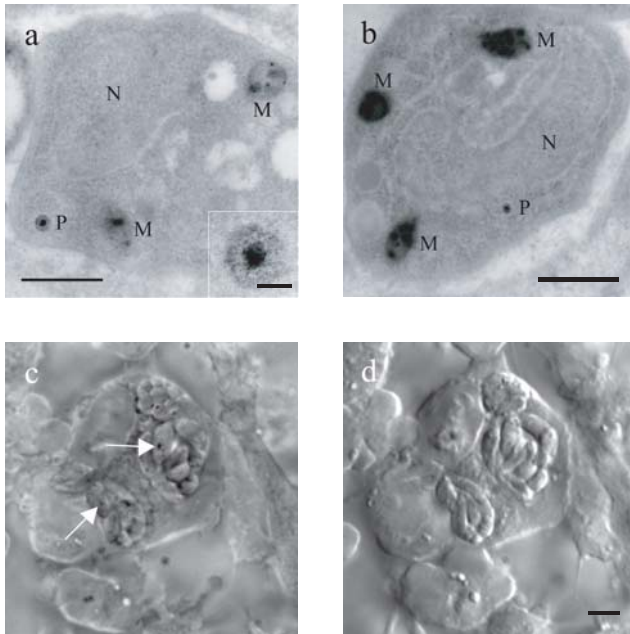


Abbildung 21: **Katalase Nachweis mit der DAB Präzipitationstechnik.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen intrazellulärer Parasiten (a und b). M Mitochondrium; N, Nucleus; p, Peroxisom (Skalierung 0,5 µm). Das Inset in a zeigt eine vergrößerte Darstellung eines Peroxisoms (Skalierung 0,5 µm). In der Lichtmikroskopie erscheint das DAB-Präzipitat als dunkle Spots im Phasenkontrastbild (c, Pfeile). In der Nomarski-Optik (d) stellen sich Parasiten besser dar.

2.5 Lokalisation mittels Histochemie

Katalase kann durch die DAB-Präzipitationstechnik licht- und elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden [22]. Diaminobenzidin (DAB) bildet mittels H_2O_2 und Katalase ein instabiles Zwischenprodukt, das spontan zu einem braunen Niederschlag oxidiert, wenn folgende Bedingungen vorliegen: eine milde Fixierung, hohe Substrat (H_2O_2) Konzentration und eine alkalische Umgebung. Spezifisch hemmbar ist dieser Prozess mit Katalase Inhibitoren, wie z. B. 20 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (AT) [21].

In der Lichtmikroskopie kann das Reaktionsprodukt im Inneren des Parasiten gefunden werden (Abb. 21 b, c). Dieses Präzipitat ist spezifisch, da es bei gleichzeitiger Inkubation mit AT nicht auftritt. Elektronenmikroskopisch finden sich 100 bis 300 nm große, spezifische Präzipitate in juxtannukleärer Position, die meist eine sehr geordnete, kristallähnliche Struktur aufweisen (Abb. 21, a, b und Inset). Zudem tritt das Reaktionsprodukt in den Cristae der Mitochondrien auf. Wird das Substrat H_2O_2 in der Präzipitationsreaktion weggelassen oder der Inhibitor AT zugegeben, verschwinden die spezifischen Präzipitate, das Signal in den Cristae der Mitochondrien jedoch bleibt. Folglich ist das Signal in den Mitochondrien ein unspezifisches Reaktionsprodukt und kann wahrscheinlich auf dort ansässige Peroxidasen [22] zurückgeführt werden.

2.6 Expression von Katalase in CHO-Zellen

Die funktionelle Bedeutung des C-terminalen peroxisomalen Targeting Signals der *T. gondii* Katalase kann durch Expression rekombinanter Proteine in Säugetierzellen und

Feststellung der Lokalisation mittels Immunfluoreszenz, getestet werden. Dafür eignen sich CHO-Zellen im besonderen, da sie ein gut definiertes peroxisomales Kompartiment aufweisen [119]. Die Lokalisation des peroxisomalen Kompartiments in der Immunfluoreszenz kann mit einem anti-SKL Antikörper gezeigt werden (Abb. 22e). Dieser Antikörper, der das C-terminale Tripeptid S-K-L erkennt, reagiert mit Peroxisomen vieler verschiedener Organismen [35].

Transiente Expression der kompletten *T. gondii* Katalase führt zu punktförmigen Signalen im Zellkörper, die mit einer peroxisomalen Lokalisation im Einklang stehen (Abb. 22c). Werden jedoch die letzten drei Aminosäuren der Katalase entfernt, verteilt sich das Signal diffus über die ganze Zelle, was charakteristisch für die zu erwartende zytosolische Lokalisation ist (Abb. 22d). Somit ist das PTS1 der *T. gondii* Katalase, zumindest in einem heterologem System, funktionell von Bedeutung.

2.7 Expression eines Reportergens in CHO-Zellen

Die Frage, ob ein PTS1-Motiv ausreichend ist, um Katalase in Peroxisomen zu importieren, kann durch einen Suffizienztest beantwortet werden. Hierbei wird das vermutliche PTS1-Motiv an ein Reportergen angehängt und dieses in CHO-Zellen exprimiert.

Expression von Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) in CHO-Zellen führt zu einer zytosolischen Lokalisation (Abb. 22b) [106]. CAT-SKL hingegen, das CAT-Gen mit dem PTS1-Motiv -SKL, ergibt ein peroxisomales Muster (nicht dargestellt), da das Protein in die Peroxisomen importiert wird [106].

Fusioniert man die drei letzten Aminosäuren der *T. gondii* Katalase (-AKM) an das CAT-Gen, ergibt sich ebenso eine peroxisomale Lokalisation (Abb. 22a). Diese Experimente zeigen, daß das PTS1 der *T. gondii* Katalase ausreicht, um den Import eines zytosolischen Reporterproteins in die Peroxisomen zu veranlassen.

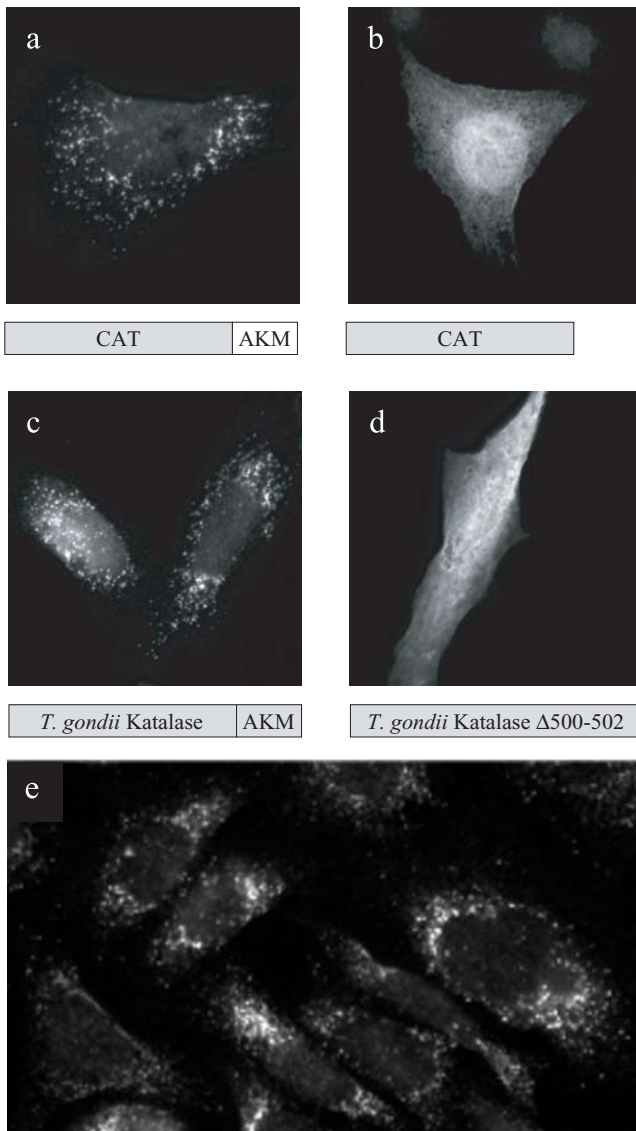


Abbildung 22: **Import der *T. gondii* Katalase und CAT in CHO-Zellen.** Die peroxisomale Lokalisation des CAT-AKM (a) und die diffuse zytosolische Verteilung der nativen CAT ohne PTS (b) in der Immunfluoreszenz. In CHO-Zellen exprimierte *T. gondii* Katalase zeigt eine gepunktete Verteilung (c). Deletion der letzten drei Aminosäuren führt zu einer zytosolischen Lokalisation (d). In (e) ist das typische peroxisomale Signal des anti-SKL Antikörpers gezeigt. Skalierung 5 μ m.

3 Materialien und Methoden

3.1 Bakterienstämme

DH5 α (Gibco BRL): F⁻ ϕ 80d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r_K⁻m_K⁺)
deoR thi-1 supE44 λ^- *gyrA96 relA1*

XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*
[F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

3.2 Parasitenstämme

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der RH-Stamm verwendet. Diese Parasitenlinie wird seit über 50 Jahren (Sabin und Feldman 1946) im Labor passagiert und hat die Fähigkeit zur Zystenbildung *in vivo* weitgehend verloren [88]. *In vitro* jedoch ist eine Induktion der Zystenbildung z. B. durch Hitzeschock noch möglich [100].

3.3 Lambda-Phagen

Folgende Lambda-Phagen-Klone aus der *T. gondii* EST Datenbank wurden verwendet:

dbEST ID	gi Nummer	Accession	EST ID	Library
571279	1370813	W63499	TgESTzy67b01.r1	ME49 tachyzoite
607975	1435613	W99737	TgESTzz06g03.r1	ME49 tachyzoite

3.4 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Vero-Zellen African green monkey kidney cells (ATCC-Nr. ⁴: CCL81)

CHO-Zellen Chinese hamster ovary cells K1 (ATCC-Nr.: CCL 61)

HFF-Zellen Human foreskin fibroblasts. Die Primärkultur dieser Fibroblasten stammt aus der Yale University Dermatology Core Facility. In dieser Arbeit verwendete Zellen waren in der 10. Passage.

⁴ATCC: American Type Culture Collection

3.5 Plasmide

Folgende Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Klonierung	pGEM-T (Promega, Madison, WI) pBluescript II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA)
Expression in <i>E. coli</i>	pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)
Expression in CHO-Zellen	DNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen Carlsbad, CA)

3.6 Primäre Antikörper

Folgende monoklonale Antikörper wurden freundlicherweise von J. F. Dubremetz, Lille, Frankreich, zur Verfügung gestellt:

T3 4A7	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Rop2,3,4-Antigen
T6 2H11	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Gra3-Antigen
D2 R3	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Mic2-Antigen

Folgende polyklonale Antiseren wurden in dieser Arbeit verwendet:

Rabbit anti-CAT	(5prime 3prime Inc., Boulder, CO)
Rabbit anti-SKL	(Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA)

3.7 Sekundäre Antikörper

Folgende sekundäre Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

FITC linked goat anti-rabbit-IgG	(Calbiochem-Novachem Corp. La Jolla, CA)
Rhodamine-linked goat anti-mouse-IgG	(Roche Molecular Biochemicals)
HRP-conjugated goat anti-rabbit-IgG	(Calbiochem-Novachem Corp. La Jolla, CA)

3.8 Kulturbedingungen für Zelllinien

Alle Inkubationen fanden bei 37° C in 5 % CO₂ Atmosphäre statt. Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Media Core Facility des Department of Cell Biology (Yale University, New Haven, CT) hergestellt.

Vero-Zellen	Minimum Eagle Medium (MEM) + 7 % FBS + Penicillin/Streptomycin
HFF-Zellen	αMEM + Glutamin + 7 % FBS + Penicillin/Streptomycin
CHO-Zellen	αMEM + Glutamin + 3.5 % FBS + Penicillin/Streptomycin

3.9 Passagieren der Zelllinien

Um eine konfluente Zellkultur auf weitere Kulturschalen (Falcon, Ø 10 cm) aufzuteilen, wurden die anheftenden Zellen mit 5 ml sterilem PBS-Puffer mehrmals gewaschen. Nach kurzer Inkubation (5 min) wurde der PBS-Puffer entfernt und durch 1 ml Trypsin-Lösung (Gibco-BRL) ersetzt. Nach kurzer Inkubation bei 37° C für 2 min wurden die Zellen in 12 ml angewärmten Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1 : 4 bis 1 : 6 auf neue Kulturschalen verteilt. Alternativ wurden 2 ml dieser Suspension auf einer 6-well Platte gleichmäßig verteilt. Die durchschnittliche Zeit bis zur erneuten Konfluenz der Zellen betrug für CHO- und Vero-Zellen etwa 2-3 Tage, für HFF-Zellen eine Woche.

3.10 Passage der Parasiten in der Zellkultur

Etwa 5×10^6 Parasiten wurden zu einer 80 % konfluente Vero-Zellkultur in einer 10 cm Kulturschale hinzugegeben und für 2-3 Tage bei 37° C in 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Während dieser Zeit vermehren sich die Parasiten in den Wirtszellen. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, mit einem Teflon-beschichteten Schaber abgekratzt und in 2 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Spritze (3 ml Luer Lock) durch eine 19 Gauge Nadel getrieben. Dadurch werden die Wirtszellen zerstört, während die Parasiten intakt bleiben. Das Lysat wurde abzentrifugiert (5 min bei 1500 rpm in einem Beckmann Swingout-Rotor), das Sediment in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und die Parasitenzahl in einer Zählkammer bestimmt.

3.11 *In vivo* Exzision

Die Klone aus der EST Datenbank (W63499 und W99737) lagen in einem Lambda ZAP II Vektor (Stratagene, La Jolla, CA) vor. Durch Koinfektion mit einem Helferphagen kann das pBluescript Phagemid, das die EST-Klone enthält, aus dem Lambda ZAP II Vektor (Abb. 23) ausgeschnitten werden und als Plasmid in *E. coli* propagiert werden [93].

Diese „*In vivo* Exzision“ ist abhängig von DNA Sequenzen im Lambda ZAP II Vektor, sowie von Hilfsproteinen eines M13 Phagen oder F1 Phagen. Die Proteine des F1 Phagen erkennen eine Region der DNA, die normalerweise der „origin of replication“ für den positiven DNA-Strang in einem F1 Phagen ist. Dieser Bereich kann jedoch in eine Initiations- und eine Terminations-Region aufgeteilt werden [25]. Zwischen diese beiden Regionen ist im Lambda Zap II Vektor der pBluescript Vektor als Träger der ESTs kloniert.

Um nun die λ-Phagen DNA den Proteinen des F1 Phagen zugänglich zu machen, wird ein *E. coli* Stamm mit beiden Phagen gleichzeitig infiziert. In *E. coli* erkennen nun

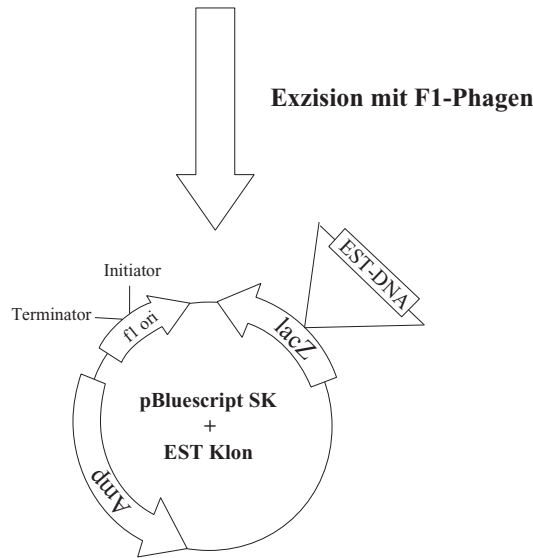
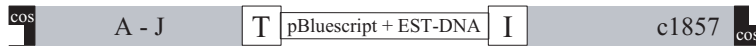


Abbildung 23: **Prinzip der *in vivo* Exzision des Lambda ZAP II Vektors.** Mittels des λ -Phagen kann eine DNA Bibliothek erstellt werden. Ko-Infektion eines Wirtsbakterium mit einem F1 Phagen schneidet den Bereich zwischen der Initiator- (I) und Terminator-Region (T) heraus und ligiert ihn, so daß sich ein funktionsfähiges pBluescript Plasmid bildet.

die F1 „Hilfs“-Proteine die Initiator-Region im λ -Phagen. Sie setzen einen „nick“ in der Initiator DNA und replizieren einen Strang bis zur Terminatorregion. Das Gen II Produkt des M13 Phagen bildet nun zirkuläre DNA, die nur noch das pBluescript Plasmid, die EST Sequenz, einen F1-origin, die Terminator- und Initiatorregion enthält, während alle anderen Sequenzen des λ -Phagen nicht mehr enthalten sind.

Die F1 Terminatorregion ermöglicht es nun, daß das Phagemid verpackt und von *E. coli* sezerniert wird. Die *E. coli* Bakterien im Überstand werden nun durch Erhitzung auf 70° C abgetötet, während das Phagemid diese Temperatur übersteht. Um doppelsträngige DNA zu erzeugen, werden frische *E. coli* Zellen mit dem Phagemid (das sich ja selbst nicht replizieren kann) inkubiert und auf Ampicillin ausgestrichen. Nur die Bakterien, die das Phagemid als Plasmid tragen, sind Ampicillin resistent und können zur DNA Isolation verwendet werden.

Als *E. coli* Stamm wurde XL1-Blue verwendet, da dieser Stamm das F'-Episome trägt, welches hier zwei Funktionen hat: Einerseits trägt es ein lacZ Gen mit der Δ M15 Mutation, das eine blau/weiß-Selektion mit dem Lambda Zap II Vektor gestattet (weiße Kolonien haben DNA in der „Multiple Cloning Site“ von pBluescript), andererseits enthält das F'-Plasmid die Gene für die Expression der F' Pili, die für eine Infektion mit einem filamentösen Phagen (F1 oder M13) benötigt werden. Zudem trägt es das TN10 Tetrazyklin-Resistenz Gen, so daß mit Tetrazyklin für das F'-Episome selektiert werden kann.

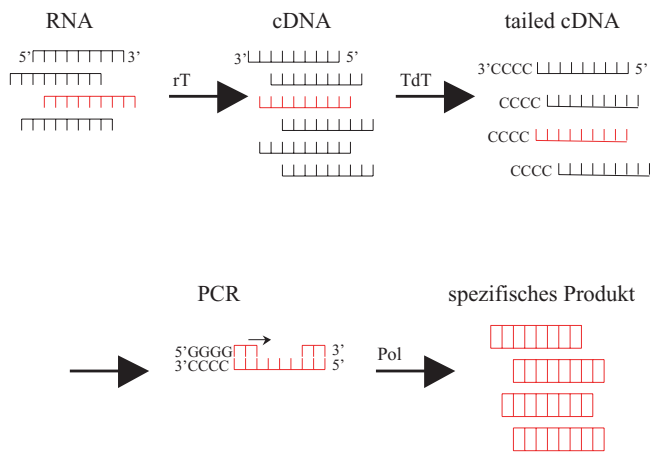


Abbildung 24: Prinzip der 5' RACE. Bei der 5' RACE wird RNA durch reverse Transkriptase (rT) umgeschrieben und die entstandene cDNA enzymatisch mittels Terminaler desoxy-nukleotid Transferase (TdT) um ca. 20 Cytosin-Nukleotide verlängert. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) kann dann das spezifische Produkt amplifiziert werden.

3.12 Praktisches Vorgehen bei der *in vivo* Excision

Eine 5 ml Schüttel-Kultur XL1-Blue wurde mit VCSM13 (kan^r) infiziert, der gegenüber dem klassischen F1-Phagen den Vorteil besitzt, eine Kanamycin Resistenz zu tragen. Mit Phagen infizierte Bakterien wurden mit Kanamycin selektiert (In 5 ml LB: 1 Kolonie XL1-Blue, 20 λ einer 20 % Maltose-Lösung, 50 λ von 1 M $MgSO_4$, nach 3 h wird Kanamycin hinzugegeben). Die Zellen wurden mit 1000 x g abzentrifugiert und in 2 ml SM Puffer resuspendiert. Alle Bakterien tragen nun den Helferphagen in sich. Es wurden 200 λ einer Lambda-Phagen-Suspension hinzugegeben und 20 min bei 37° C inkubiert, damit sich die Phagen an die Bakterien anheften können. Nach Zugabe von 5 ml 2xYT Medium wurde nochmals für 3 h bei 37° C inkubiert. In dieser Zeit integriert sich der Lambda Phage im Chromosom und der Bluescript Vektor wird vom Helferphagen ausgeschnitten. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (4000 x g für 5 min) und 20 min auf 70° C erhitzt. Nach Abkühlung wurden 200 λ des Überstands mit 200 λ XL1-Blue Zellen für 15 Min. bei 37° C inkubiert. Während dieser Inkubation infiziert das Phagemid *E. coli* und repliziert sich als Plasmid. Danach werden 10 λ und 100 λ auf Ampicillin Platten ausgestrichen. Kolonien wurden isoliert, eine Plasmid-Präparation durchgeführt und die Plasmid-DNA sequenziert.

3.13 „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (5' RACE)

Mittels 5' RACE kann die Sequenz einer mRNA upstream von einem bekannten Teilstück bestimmt werden. Hierbei werden enzymatisch mehrere Cytosin-Nukleotide an das 3'-Ende der cDNA angehängt und dieses mit einem komplementären Primer in mehreren nested PCRs amplifiziert, was die nachfolgende Klonierung und das Screening vereinfacht (Abb. 24). Die einzelnen Schritte sind im folgenden kurz dargestellt.

Zur RNA-Isolierung wurde TRIzol Reagenz nach den Angaben des Herstellers (Life Technologies, Rockville, MD) verwendet. Die mRNA wurde mit Superscript II reverse Transkriptase (Life Technology, Rockville, MD) in cDNA umgeschrieben, dann die mRNA mit RNaseH degradiert und die cDNA über Qiaquick-Säulen (Qiagen, Valencia, CA) aufgereinigt. Bei der sogenannten „Tailing“-Reaktion wird durch die Terminale-deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) eine Kette von entsprechend zugegebenen Nukleotiden an das 3'-Ende der cDNA angehängt. Die Länge dieses poly-Nukleotid-Stückes kann über die Reaktionsdauer gesteuert werden. Hier wurde mit Cytosin und einer Reaktionsdauer von 12 Minuten gearbeitet, was erfahrungsgemäß einen poly-C Stretch von durchschnittlich 15-20 Basen erzeugt. Durch nested PCR wird die cDNA amplifiziert, wobei spezifische Primer auf der einen und ein poly-dG Primer auf der anderen Seite benutzt wird. Das entstehende Reaktionsprodukt wird auf einem Agarose-Gel aufgetragen, ausgeschnitten, aufgereinigt und in den pGEM-T Vektor ligiert. Durch Screening der Kolonien mittels PCR werden positive Klone identifiziert, das Plasmid aufgereinigt und die Sequenz analysiert.

3.14 Sequenzierung

Die Basenabfolge der Katalase wurde mittels Sequenzierung vier unabhängiger Klone eines per RT-PCR (F4, R0) gewonnen Fragmentes von 2480 bp bestätigt. Es wurden jeweils beide Stränge eines DNA Stückes mittels Dideoxy-Sequenzierung analysiert. Die Sequenzierung der DNA wurde vom W.M. Keck Sequencing center, Yale University School of Medicine, durchgeführt.

3.15 Herstellung des Antiserums gegen *T. gondii* Katalase

Mittels Polymerase Kettreaktion (PCR) wurde das entsprechende Stück der *T. gondii* Katalase amplifiziert (Primer: ExF und ExR) und in die *Bam*HI und *Xma*I Schnittstelle des Vektors pGEX-4T-1 kloniert. Das entstandene GST-Katalase-Fusionsprotein wurde in *Escherichia coli* exprimiert, die Synthese mit Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (IPTG) induziert und das Fusionsprotein über Glutathion-Sepharose Perlen aufgereinigt (Abb. 25). Im folgenden wird dies näher beschrieben.

Eine 6 ml Übernachtskultur wurde mit LB Medium und Ampicillin auf 300 ml verdünnt und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bei 37° C geschüttelt. Nach Zugabe von 0.5 mM IPTG zur Induktion der Fusionsprotein-Synthese wurden weitere 4 h geschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, und mit 20 ml eiskaltem STE gewaschen. Die eine Hälfte des Ansatzes wurde für spätere Verwendung eingefroren, mit der

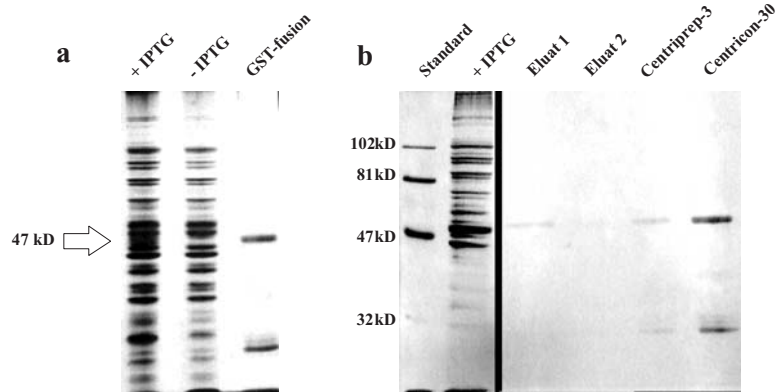


Abbildung 25: **Aufreinigung des GST-Katalase Fusionsproteins.** In (a) sind die Unterschiede zwischen induzierten und nicht induzierten Bakterien in der SDS PAGE mit Coomassie-Färbung dargestellt. Das Fusionsprotein ist bei 47 kDa in den mit IPTG induzierten Bakterien (a, Spur 1) zu sehen. Dem aufgereinigten Fusionsprotein als positive Kontrolle (a, Spur 3) entspricht die Bande bei 47 kDa. Die Bande bei 20 kDa entspricht einem Fragment des Fusionsproteins. Die Aufreinigung des Fusionsproteins mittels einer Abfolge von verschiedenen Auftrennungs- und Konzentrationsschritten ist in (b) auf einem Silber-Gel dargestellt.

anderen auf Eis weitergearbeitet. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurde das Sediment in 6 ml STE gelöst und Lysozym auf 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde DTT auf 5 mM und N-Laurylsarcosin auf 1,5 % hinzugegeben [32]. Die Probe wurde 5 s gevortext, 60 s im Eisbad beschallt und bei 10.000 x g für 5 Min. abzentrifugiert. Bei sehr viskösen Proben wurde die chromosomale DNA mittels Passage durch eine 25 Gauge Nadel geschert. Zum Überstand wurde Triton X100 auf 2 % hinzugegeben und 5 s gevortext. 5 ml einer Suspension von Agarose Perlen in PBS (50/50) wurden hinzugegeben und auf einem rotierendem Rad 15 Min. inkubiert. Die Glutathion-Sepharose Beads wurden 6 Mal in eiskaltem PBS gewaschen und dann zweimal mit jeweils 2,5 ml Elutions-Puffer eluiert. Um die Proteinkonzentration der Probe zu erhöhen, wurde sie mit Centriprep (Millipore, Bedford, MA) nach Angaben des Herstellers konzentriert. Die Probe wurde mit 10 % Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

Seren von speziellen, pathogen-frei gezüchteten Hasen wurden auf Reaktivität mit *T. gondii* in Western Blots überprüft und ein Tier mit geringem Antikörper-Titer ausgesucht (Abb. 26, Spur 38). Die Immunisierung des Hasen mit jeweils 100 μg Protein wurde von Cocalico Biologicals (Reamstown, NJ, USA) durchgeführt. Der Verlauf der Antikörperbildung wurde regelmäßig mittels Western Blot getestet. Nach drei Immunisierungen innerhalb von zwei Monaten wurde sämtliches Serum entnommen.

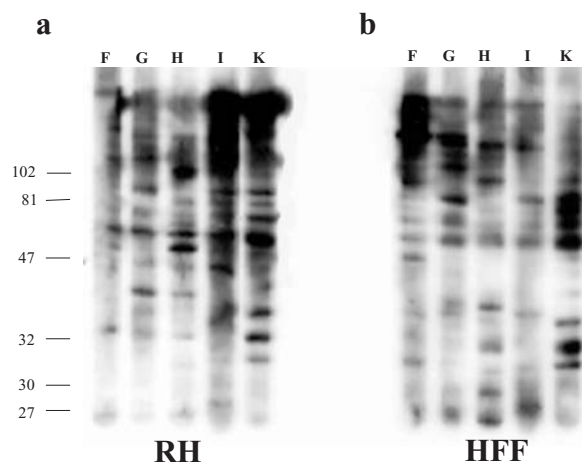


Abbildung 26: **Screening der Prä-immun-Sera.** Test der Sera auf Reaktion mit *T. gondii* Proteinen vor der Immunisierung. In jeder Spur wurde das native Serum eines Hasen aufgetragen. In (a) wurden Parasiten aufgetragen, die in HFF-Zellkultur angezüchtet wurden und in (b) HFF-Zellen ohne Parasiten als Kontrolle. Zur Immunisation wurde der Hase G gewählt, da die Signale in (a) überwiegend auch in (b) zu finden sind, was für einen niedrigen endogenen Antikörper-Titer gegen *Toxoplasma* Proteine spricht.

3.16 Antikörper Aufreinigung

Zur Kopplung des Fusionsproteins an CNBr-aktivierte Agarose (Sigma, St. Louis, MO) wurde folgende Methode durchgeführt. In 2 ml einer 1 mM HCl-Lösung wurden 500 mg der Agarose-Kügelchen über Nacht eingeweicht und anschließend mehrmals in H₂O gewaschen. Die Agarose wurde in Bindungspuffer (50 mM Na₂CO₃, 50 mM NaCl pH=9,0) resuspendiert, der 500 µg des Antigens enthielt. Nach einer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden die freien Bindungsstellen durch Zugabe von 1 M Ethanolamin während einer 4 h Inkubation abgesättigt. Die Agarose-Kügelchen wurden anschließend in PBS-Puffer gewaschen und nach Zugabe eines Konservierungsmittel bei 4° C aufbewahrt. Die Bindung der Antikörper an das immobilisierte Antigen erfolgte in PBS-Puffer bei 4° C über Nacht. Nicht gebundene Bestandteile des Serums wurden beim Waschen mit PBS-Tween (0,1 %) entfernt. Danach wurden die gebundenen Antikörper mit einem Gelatine-Glycine-Puffer (pH = 2,8) eluiert und das Eluat schnellstmöglich durch Zugabe von TRIS Base neutralisiert. Die Effizienz der Antigenbindung an die Agarose, sowie der Antikörperaufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot überprüft.

3.17 Western Blot

Western-Blots wurden nach einem Standard-Protokoll durchgeführt [55]. Circa 5x10⁶ Parasiten oder eine äquivalente Menge an Wirtszellmaterial wurden abzentrifugiert, mit Lade-Puffer versetzt, auf einem 10 % SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach Inkubationen mit primären und HRP-konjugierten sekundären Antikörpern und entsprechenden Waschrufen wurde das Signal mittels Chemolumineszenz (ECL-Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) nachgewiesen.

Antikörper-Konzentrationen:

T. gondii Katalase Antiserum 1 : 500

HRP-konjugierter goat anti-rabbit IgG Antikörper 1 : 2000

3.18 Immunfluoreszenz

Für den Immunfluoreszenz-Assay wurden Zellen auf runden Deckgläschen mit 15 mM Durchmesser über Nacht herangezogen. Nach dreimaligem Waschen in PBS++ (1mM CaCl₂ und 1 mM MgCl₂ als Zusatz zu PBS-Puffer) innerhalb von 5 min mit ca. 2 ml/well wurden die Zellen in 3 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Dann folgte wiederholtes dreimaliges Waschen und anschließend eine Permeabilisierung der Membran mit 0.1 % Triton X-100 in PBS++ für 5 Minuten. Nach anschließendem zweimaligem Waschen in PBS++ wurden durch Inkubation für 30 Minuten mit 50 % Ziegen-Serum freie Bindungsstellen geblockt. Die Antikörper wurden in 3 % BSA in PBS++ verdünnt, die Deckgläschen umgekehrt auf einen Tropfen dieser Lösung gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in PBS++ wurde mit dem zweiten Antikörper auf die gleiche Weise inkubiert. Nach 30 Minuten wurden drei weitere Waschschritte mit PBS++ vorgenommen und die Deckgläser mittels Mowiol 40-88 (Sigma St. Louis, MO) auf einem Objektträger upside-down montiert. Nach 4 h Aushärtung können die Präparate betrachtet werden.

Alternativ kann die Fixation für 15 min in eiskaltem Aceton erfolgen. Dabei entfällt der anschließende Permeabilisierungsschritt mit TritonX-100. Eine Färbung des Apikoplast läßt sich durch Zugabe von wenigen Kristallen 4',6-Diamidino-2-Phenylindol in die Einbettungsflüssigkeit erreichen.

Antikörperkonzentrationen für den Immunfluoreszenz Assay

<i>T. gondii</i> Katalase Antiserum	1 : 250
aufgereinigtes <i>T. gondii</i> Katalase Antiserum	1 : 5
Rabbit anti-CAT	1 : 500
Rabbit anti-SKL	1 : 500
T3 4A7	1 : 250
T6 2H11	1 : 250
D2 R3	1 : 250
FITC linked goat anti-rabbit IgG	1 : 500
Rhodamine-linked goat anti-mouse-IgG	1 : 500

3.19 DAB Präzipitation

Die Parasiten wurden in der Kulturschale für 15 min mit 1,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M PI-PES Puffer (pH 7,4) fixiert, zweimal in PBS und einmal in Teorell-Stenhagen (T/S) Puffer (pH 10,5) gewaschen. Nach einer zweistündigen Inkubation mit 2 mM DAB in T/S wurde H_2O_2 in einer End-Konzentration von 1,5 % für 1-3 h hinzugegeben, danach jeweils einmal mit T/S und 100 mM Natrium-Cacodylat (pH 7,4) gewaschen und die Probe über Nacht bei 4° C in 2,5 % Glutaraldehyd und 100 mM Natrium-Cacodylat fixiert. Die Probe wurde mittels eines Teflon Schabers in ein Eppendorf-Cap überführt und in EPON eingebettet. Im Microtom wurden 60-80 nm dicke Schnitte angefertigt und auf Formvar beschichteten Nickel Trägern montiert. Die Schnitte wurden nicht mit Bleizitrat gegengefärbt, damit das DAB Präzipitat leichter erkannt werden kann. Zur Kontrolle wurden Inkubationen ohne H_2O_2 oder in Anwesenheit eines Katalase Inhibitors (z. B. 20 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol) durchgeführt.

Sämtliche Materialien für die Elektronenmikroskopie wurden von der Firma Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA bezogen. Für die Lichtmikroskopie wurde obige Prozedur auf Objektträgern durchgeführt, die nach der Inkubation mit H_2O_2 untersucht werden können.

3.20 Klonierung der Expressions-Konstrukte

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die DNA-Sequenz der Chloramphenicol-Acetyltransferase um die Aminosäuren -AKM am C-terminus erweitert, sowie an den Enden eine *Hind*III und *Kpn*I Restriktionsenzym-Schnittstelle eingefügt. Das entstandene PCR-Produkt wurde in den pcDNA3.1/Zeo(+)-Vektor eingefügt, der für die Expression des CAT-AKM Genprodukts in Säugerzellen einen Zytomegalie-Virus-Promoter enthält.

Auf die gleiche Weise wurde die *T. gondii* Katalase in die *Nhe*I und *Bam*HI Restriktionsenzym-Schnittstellen des pcDNA3.1/Zeo(+)-Vektors eingefügt. Die unterschiedliche Länge der *T. gondii* Katalase wurde durch Verwendung verschiedener Primer erreicht: NheCat und AKMBgl für die volle Länge, NheCat und CYPBgl für die drei Aminosäuren kürzere Version.

3.21 Transfektion der CHO-Zellen

Zur Transfektion der Säugerzellen wurde Superfect (Qiagen, Valencia, CA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Transfektion wurde in Kulturschalen durchgeführt,

die Zellen nach 24-48 h auf Deckgläser umgesetzt und 24-48 h später mittels Immunfluoreszenz angefärbt.

3.22 Allgemeine molekularbiologische Techniken

Die Plasmid-Präparationen wurden nach dem alkalische Lyse-Verfahren durchgeführt [55], bzw. Mini-, Midi- und Maxiprep-Kits (Qiagen, Valencia, CA) benutzt. Als Enzyme für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde *Taq*-Polymerase und *Pfu*-Polymerase (New England Biolabs, MA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Alle Restriktionsendonukleasen, die T4-DNA-Ligase und die Calf-Intestinal-Phosphatase wurden von New England Biolabs, MA, bezogen und nach Angabe des Herstellers verwendet.

Die Auftrennung von DNA erfolgte auf Gelen aus Seakem LE Agarose oder Seaplaque Agarose (Sigma, St. Louis, MO). Die DNA wurde mit Ethidiumbromid unter UV-Licht dargestellt. DNA wurde aus Seaplaque Agarose-Gelen mit Phenol extrahiert und auf einer Qiaquick-Säule (Qiagen, Valencia, CA) aufgereinigt. Proteine wurden auf Acrylamid-Gelen mittels SDS-PAGE nach einem Standardverfahren aufgetrennt [55].

Transformations-kompetente *E. coli* wurden mit der CaCl₂-Methode hergestellt und die Transformation mit Hitzeschock eingeleitet [55].

3.23 Oligonukleotide und Chemikalien

Sämtliche Oligonukleotide (siehe Tabelle 4) wurden von der W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory (Yale University, New Haven, CT) bezogen. Alle weiteren Chemikalien, deren Hersteller nicht aufgeführt ist, wurden von Sigma (St. Louis, MO) bezogen.

3.24 Protein-Modellierung mit Swissmodel

Die Modellierung der *T. gondii* Katalase wurde mit Hilfe des Swiss-Model-Servers⁵ vorgenommen. Dieser Server vergleicht die eingegebene Aminosäuresequenz mit den Sequenzen experimentell erfaßter 3D-Strukturen mittels BlastP2 und sucht geeignete Vorlagen für ein 3D-Modell aus. Anschließend wird mittels ProModII die eingegebene Sequenz anhand der dreidimensionalen Vorlagen modelliert und eine Energieminimierung

⁵<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>

Name	Sequenz
R0	TTCTCGTTCAGAAAGTGCTG
R1	CATTTCTGTCTTCCTTTGGAAAGC
R2	TCGCCTGCCTGAGATGC
R3	GGGAAACTCTCGCTTGGC
R4	CATTACCTGAATACAGAAGG
R5	GGCGTTGAACAGGTCACG
R6	GTCGCGCCTGGTGTCC
R7	CACTCCCCGACTCGCC
R9	GGAAGTTACTCAGGATCGC
F1	GCTGCAGGGACGCATGTTCTC
F4	GTGCGGCTCCTCGAAGG
Fdeg	CCnGArmGnGTnGTnCAyGC
ExF	CGGGATCCCCGAGCGAAGATCGCATGC
ExR	TCCCCCGGGACAACGCACGCCTAC
NheCat	CTTCGTCAGCTAGCATGACTCAGGTTCCGCCCG
AKMNot	CGTTTAGCGGCCGCAGATCTACATCTTGGCTGGGTAG
CYPNot	CGTTTAGCGGCCGCAGATCTATGGGTAGCACGCCGCAG
CATFHind	CCCAAGCTTAATGCATGAGAAAAAATCACTGG
CATAKMKpn	GGGGTACCTTACATCTTTGCTCCCCGCCCGCCCTGCC

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Primer. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind fett gedruckt. n = A,C,G,T; r = A,G; m = A,C; y = C,T.

mit Gromos96 durchgeführt [36, 80, 81]. Die Ausgabe erfolgt als PDB-Datei, die alle modellierten Atomkoordinaten enthält. Diese Datei kann nun mit Hilfe eines PDB-Viewers dargestellt werden.

Die Aussagekraft der 3D-Modelle hängt von mehreren Einflußgrößen ab. Man unterscheidet zwischen der *correctness*, die von der Qualität des Alignments abhängt, und der *accuracy*, die Abweichung des errechneten Modells von der experimentell gewonnenen Struktur beschreibt. Bei mangelnder *correctness* treten Fehler beim Alignment auf und die entsprechende Region wird räumlich falsch modelliert. Diese Fehler können durch ein sorgfältiges Alignment vermieden werden. Zum Teil fallen diese durch stereochemisch unmögliche Konformationen auf. Die Abweichung eines errechneten Modells von einer experimentell bestimmten Struktur, *accuracy*, kann zwei Ursachen haben. Einerseits Fehler im Modelling-Verfahren, andererseits die Variabilität in den Verfahren der experimentellen Strukturbestimmung.

Um eine genauere Vorstellung von der *accuracy* zu bekommen wurden im 3DCrunch-Projekt 1200 Modell/Struktur-Paare verglichen [91]. Es zeigte sich, daß eine Überein-

stimmung der Aminosäuresequenz zwischen Modell und Vorlage von über 70 % zu äußerst präzisen Strukturvorhersagen führt. Diese Modelle sind aufgrund ihrer Präzision u. a. für Compound-Optimierung im Drug Design geeignet. Modelle mit korrekten Alignment trotz geringerer Sequenzübereinstimmung sind noch immer nützliche Werkzeuge bei „rational mutagenesis“ Experimenten. Modelle mit inkorrekten Alignment haben ihre Aussagekraft in den Regionen mit falschen Alignment verloren, können aber für die anderen Regionen durchaus korrekt modelliert sein.

Die Modellstruktur der Aminosäuren 10 bis 490 der *T. gondii* Katalase wurde mittels dem Swiss-Model-Server anhand folgender Strukturen der bovinen Katalase aus der ExNRL-3D Datenbank errechnet: 4BLCA, 8CATA, 7CATA, 4BLCD, 4BLCC. Die hohe Identität der Aminosäuren zwischen *T. gondii* und boviner Katalase (63 %) läßt auf eine hohe Qualität des Modells schließen.

Die fehlenden N- und C-terminalen Aminosäuren wurden mit dem Swiss PDB Viewer von Hand hinzugefügt. Da keinerlei Daten über die dreidimensionale Anordnung dieser Aminosäuren vorhanden ist, sind Fehler in diesem Bereich des Modells unvermeidlich. Das Rendering der Stereo-Abbildungen wurde mittels Raytracing (Pov-Ray) durchgeführt. Ein 3D-Effekt läßt sich bei den Stereobildern durch leichtes Einwärtsschieben erreichen.

3.25 Verwendete Software

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Textsatzprogramm L^AT_EX 2_ε und B^IB_TE_X 0.99c aus der Distribution MiK_TE_X 2.0⁶ gesetzt. Abbildungen wurden mit Adobe Photoshop 5.5 und Adobe Illustrator 8.0 bearbeitet. Die 3D-Modellierung der *T. gondii* Katalase wurde mit Swiss-PdbViewer v 3.7⁷ durchgeführt und mit Pov-Ray 3.1⁸ nachbearbeitet.

⁶<http://www.miktex.de>

⁷<http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html>

⁸<http://www.pov-ray.org>

3.26 Puffer und Lösungen

10 x PBS	800 ml dH ₂ O, 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na ₂ HPO ₄ , 2.4 g KH ₂ PO ₄ , auf 1 Liter auffüllen, pH auf 7,2 bringen, 1 x Lösung autoklavieren und bei Raumtemperatur aufbewahren.
PBS++	1 l 1 x PBS, 1 ml 1 M MgCl ₂ und 1 ml 1 M CaCl ₂ hinzugeben, bei Raumtemperatur lagern.
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA: 0.06 g Tris, 0.19 g Na ₂ EDTA in 50 ml dH ₂ O, pH auf 7,6 einstellen.
20 x TBE	108 g Tris, 55 g Borsäure in 900 ml dH ₂ O, 80 ml 0,25 M EDTA pH 8,0 hinzugeben, pH auf 8,4 bringen und auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen.
EDTA	9.3 g NaEDTA in 100 ml dH ₂ O, 10 N NaOH zugeben bis zu einem pH von 8,4.
STE	10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA.
Elutions-Puffer	75 mM Hepes (pH 7,4), 150 mM NaCl, 10 mM reduziertes GSH, 5 mM DTT, 2 % N-Octylguanid.

3.27 Benutzte Geräte

Die folgende Tabelle führt einige bisher nicht näher bezeichnete Geräte an. Kleinere Laborgeräte und Massenartikel, wie z. B. Pipettenspitzen, wurden ausgelassen.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Elektronenmikroskop	Philips 101	Philips Inc., Peawick, NY
Fluoreszenz-Mikroskop	Microphot-FxA	Nikon, JP
Ölimmersionsobjektiv	PlanApo100/1.40	Nikon, JP
Quecksilberdampfampe	HB10101 AF	Nikon, JP
Kamera	Sensys II	Photometrics, NJ
Spektrometer	Genesys 5	Spectronic Instruments, Rochester, NY
SpeedVac	DNA110	Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY
Transilluminator	FBTIV88	Fisher Scientific
PCR-Gerät	Thermal-Cycler III	Hybaid, NJ
Gene Pulser	Biorad 2010	Bio-Rad Inc. Hercules, CA
Sonicator	Modell G112SP1G	Laboratory Supplies Co. Inc., Hicksville, NY
Tabletop-Zentrifuge	Eppendorf 5415c	Fisher Scientific
Swingout Rotor	Modell GPR	Beckman Inc, Wakefield, MA

4 Diskussion

Die Katalase ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym das in vielen Organismen eine wichtige Bedeutung für den Stoffwechsel hat. Sie katalysiert die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff und verringert somit die Bildung von freien Radikalen. Dadurch schützt sie vor deren toxischen Wirkung auf DNA, Proteine und Lipide [54]. Da Wasserstoffperoxid leicht über biologische Membranen diffundieren kann, ist es auch ein wesentlicher Bestandteil der Immunabwehr und tötet z. B. Bakterien in den Phagosomen ab [41]. Reaktive Sauerstoffradikale sind ein wesentlicher Abwehrmechanismus zur Bekämpfung einer *Toxoplasma gondii* Infektion [40,65–68]. Untersuchungen an Ucp2-Knockout Mäusen, die resistent gegen Infektionen mit *Toxoplasma* sind, untermauern dies [3]. Die Makrophagen dieser Knockout-Mäusen produzieren größere Mengen freier Radikale als Wildtyp-Makrophagen und können *Toxoplasma gondii* fünffach besser abtöten.

Ein Vergleich der Protein-Expression zwischen einem Wildtyp und einem attenuierten *T. gondii* Stamm, ersterer wurde in Mäusen passagiert, letzterer ausschließlich in Zellkultur, ergab eine verminderte Expression der Katalase in dem attenuierten Stamm [73]. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß Katalase ein Pathogenitätsfaktor ist.

Gegen die Sauerstoffradikale der Makrophagen schützt sich *T. gondii* mit einer Reihe von Enzymen. Die schon vor langer Zeit beobachtete hohe Resistenz gegen H_2O_2 [66] erklärt sich aus dem Zusammenspiel von Katalase [45,95] Superoxid-Dismutase [74,95], Peroxidasen und Peroxiredoxin [102].

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Katalase von *Toxoplasma gondii* kloniert und genauer untersucht. Die Ergebnisse unserer Sequenzierung bestätigten Ding *et al.* in einer zeitgleichen, unabhängigen Arbeit [23]. Außerdem konnte diese Gruppe mit Northern- und Southern-Blot-Analyse die Transkription der Katalase DNA nachweisen.

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich im Western-Blot mit einem polyklonalen Antiserum gegen ein Katalase-GST-Fusionsprotein ein Protein in der Größe von ca. 63 kDa. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der berechneten Größe. Somit gehen wir davon aus, daß das Antiserum in der Tat mit Katalase reagiert.

Die starke Konservierung von Katalase verschiedener Organismen über die Artgrenzen hinweg begünstigt eine strukturelle Analyse. So können Voraussagen über strukturelle Zusammenhänge durch Analogieschluss mit hoher Wahrscheinlichkeit getroffen werden. Die absolute Konservierung der Aminosäuren, die für die Bindung des Häm- und NADPH-Moleküls verantwortlich sind und das aktive Zentrum bilden, läßt auf eine Ähnlichkeit des katalytischen Reaktionsmechanismus schließen. Aminosäurereste, die

in anderen Katalasen mit den anderen Untereinheiten interagieren, sind auch in der *T. gondii* Katalase vorhanden. Dies spricht für eine Organisation der Katalase als Homotetramer, wie sie bei allen bisher bekannten eukaryontischen Katalasen vorkommt. Das C-terminale PTS1 der *T. gondii* Katalase legt eine Lokalisation in einem peroxisomalen Kompartiment nahe.

Die starke Homologie der *T. gondii* Katalase zu anderen Katalasen begünstigt auch Aussagen über die Struktur des Enzyms im dreidimensionalen Raum. Durch Vergleich mit bekannten Röntgendiffraktions- oder NMR-Strukturen kann eine Modellierung des Proteins erfolgen. Hierfür sind zahlreiche Computeralgorithmen entwickelt worden. Eine Nachbearbeitung zur Verbesserung und Erweiterung eines computergenerierte Modells wird von Hand vorgenommen. Entscheidend für die Qualität der Modellierung ist einerseits die Kenntnis der räumliche Auflösung der Vorlage und andererseits die Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zwischen Modell und Vorlage. Im Falle der *T. gondii* Katalase sind beide Einflußfaktoren günstig verteilt: Mit einer Homologie von 63 % zur bovinen Katalase und einer Auflösung deren Kristallstruktur von 2.5 Å finden sich sehr gute Voraussetzungen. Da sich die meisten Katalasen relativ einfach kristallisieren lassen, stehen mehrere dreidimensionale Strukturen als Vorlage zur Verfügung [24, 33, 47, 85].

Durch die dreidimensionale Modellierung von Proteinen können die sterischen Verhältnisse wesentlich anschaulicher dargestellt und besser interpretiert werden. Bei der Sekundärstruktur der Katalase fällt ein β -Barrel aus acht antiparallelen β -Faltblattstrukturen auf, das das Häm-Molekül auf einer Seite abschirmt, während die andere Seite relativ frei zugänglich ist. Ein Kanal führt direkt zum Eisenatom des Häms und dient dem Anfluten des Substrats H_2O_2 . Die Modellierung des aktiven Zentrums und der NADPH-Bindungsstelle illustriert die räumliche Anordnung der katalytischen Aminosäurereste. Auch die Interaktionen zwischen den Monomeren sind durch eine 3D-Ansicht wesentlich anschaulicher dargestellt.

In den meisten eukaryontischen Zellen liegt Katalase in den Peroxisomen (Microbodies) vor. Aus diesem Grunde ist sie zum Leitenzym dieses Kompartiments geworden. In einigen Fällen jedoch, wie z. B. in *Saccharomyces cerevisiae*, finden sich zwei Isoformen, von denen die eine in Peroxisomen und die andere im Zytosol vorliegt. In *Toxoplasma* haben wir, sowie Ding *et al.*, keine weitere Isoform der Katalase gefunden. Um die Lokalisation der Katalase in *T. gondii* zu klären, haben wir die Verteilung licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit einem Antiserum gegen *T. gondii* Katalase zeigte sich ein punktförmiges Signal im vorderen Ende des Parasiten, das an vesikuläre Strukturen erinnert. Zudem lag ein diffuses, aber spezifisches Signal innerhalb des Para-

siten vor, das zytosolisch anmutet. Gleichzeitiges Anfärben verschiedener Zellorganellen (Rhoptrien, Granula densa, Mikronemen und der Apikoplast) zeigte keine Signalüberlagerung. Daher muß davon ausgegangen werden, daß das vesikuläre Signal einem nicht näher definierten Kompartiment entspricht.

Allerdings sind in *Toxoplasma* nicht alle Kompartimente definiert, die in Säugetierzellen bekannt sind. So gibt es kein überzeugendes Äquivalent für die Lysosomen und Endosomen. Obwohl es einige Hinweise für eine Rezeptor vermittelte Endozytose an der „micropore“ (einem spezialisierten, eingestülpten Bereich der Zellmembran) gibt [72], entzieht sich die Endozytose des Parasiten bisher der experimentellen Untersuchung [92]. Auch der Nachweis von Lysosomen ist bisher nicht gelungen.

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Katalase-Aktivität durch DAB-Präzipitation zeigte 100-300 nm große, runde Ablagerungen. Diese Ablagerungen traten zu meist in juxt nukleärer Position auf und enthielten kristallähnliche Einschlüsse. Durch gleichzeitige Inkubation mit einem Katalase-Inhibitor oder bei Auslassung des Substrats (H_2O_2) verschwinden diese Ablagerungen, während das unspezifische Signal in den Mitochondrien bestehen bleibt. Dies spricht für ein Katalase-spezifisches Signal in den runden Ablagerungen. Aus der geringen Häufigkeit der runden Präzipitate (1 auf 20-30 Parasitenanschnitte) kann man schließen, daß nur wenige Strukturen pro Parasit vorliegen. Dies steht im Einklang mit den Immunfluoreszenz-Bildern auf denen jeweils 2-5 punktförmige Signale pro Parasit zu sehen sind.

Unsere Ergebnisse legen nahe, daß wir ein bisher noch nicht näher definiertes, subzelluläres Kompartiment entdeckt haben. Es befindet sich im vorderen Ende der Parasiten, in der Nähe des Golgi-Apparats. In diesem Bereich liegt vermutlich auch das Zentromer, das Organisationszentrum der Mikrotubuli. Aus Experimenten an CHO-Zellen ist bekannt, daß Peroxisomen sich entlang Mikrotubuli bewegen können [83, 115]. Allerdings findet man in vielen anderen eukaryontischen Zellen eine Vielzahl von Vesikeln in der Nähe des Zentromers.

Das in der Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbare, diffuse Signal innerhalb des Parasiten spricht für die Existenz eines Katalase-Pools im Zytosol. Dies könnte durch eine Sättigung der Importmaschinerie oder eine andere Isoform hervorgerufen sein. Ding *et al.* haben allerdings keine weiteren Katalasen im *T. gondii* Genom entdeckt [23]. Der zytosolische Pool der Katalase könnte ein Schutzmechanismus gegen freie Radikale sein, der das Überleben des Parasiten bei einer Immunreaktion des Wirtes sichert.

Entscheidend für die Definition eines peroxisomalen Kompartiments ist eine umgebende Membran. Die hier verwendeten elektronenmikroskopischen Methoden können diese leider nicht überzeugend darstellen, da keine Gegenfärbung mit Bleizitrat durch-

geführt wurde. Andererseits wird durch Auslassung der Gegenfärbung die Möglichkeit falsch positive Resultate zu erreichen, stark verringert. Der Versuch, durch Immunogold-labeling mit dem polyklonalen Antiserum gegen Katalase elektronenmikroskopisch eine Klärung herbeizuführen, ist uns und anderen Arbeitsgruppen bisher nicht gelungen.

Ein weiteres Argument für eine peroxisomale Lokalisation der *T. gondii* Katalase ist die Tatsache, daß sie in einem heterologen System (CHO-Zellen) in die Peroxisomen transportiert wird. Die Funktionalität des PTS1 der *T. gondii* Katalase in CHO-Zellen erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß ein solches Signal in *Toxoplasma* auch funktionell in *T. gondii* von Bedeutung ist. Eine endgültige Klärung der Bedeutung des PTS1 kann jedoch nur durch Expression der rekombinanten Katalase in einem *T. gondii* Katalase knock-out Stamm erzielt werden. Die dafür nötige Methodik ist seit einiger Zeit entwickelt [88].

Die Funktion eines peroxisomalen Kompartimentes in *T. gondii* ist zur Zeit nicht abzuschätzen. Viele Stoffwechselwege bieten sich an. Von besonderem Interesse ist der Beitrag peroxisomaler Enzyme in der Lipid-Synthese und Metabolismus. Der Parasit scheint unfähig zu sein, Cholesterol und Phospholipide *de novo* zu synthetisieren und bekommt diese von der Wirtszelle [17]. Andererseits werden Enzyme der Fettsäurebiosynthese in den Apikoplast importiert, ein Überrest eines Chloroplasten in vielen, wenn nicht allen Apikomplexa [87]. Das Vorkommen von Enzymen des Glyoxylat-Zyklus wie Isozitratlase und Malat-Synthetase [62], die in den Glyoxysomen der Pflanzen enthalten sind, konnte von uns nicht eindeutig bestätigt werden, jedoch sind diese Enzyme potentiell in Peroxisomen anzutreffen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Existenz eines peroxisomalen Kompartimentes in *T. gondii* nicht zweifelsfrei geklärt werden, jedoch eröffnet sie die Möglichkeit in neuer Weise über Stoffwechselforgänge dieses Parasiten nachzudenken. Eine genauere Untersuchung der Peroxisomen von *T. gondii* führt letztlich zu einem genaueren Verständnis des Metabolismus des Parasiten und potentiell zu neuen therapeutischen Ansätzen.

5 Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer, einzelliger Parasit aus dem Phylum der Apicomplexa. Infektionen des Menschen mit *T. gondii* verlaufen meist subklinisch. Nach einer Infektion persistiert der Erreger für viele Jahre in Hirn- und Muskelgewebe. Durch Reaktivierung des Erregers, z. B. durch eine Immunschwächekrankheit oder unter Immunsuppression, kann eine Enzephalitis mit septischer Streuung entstehen. Eine diaplazentare Infektion führt zur Fetopathia toxoplasmotica mit Früh- und Totgeburten oder zu der typischen enzephalitischen Trias aus Chorioretinitis, Hydrozephalus und zerebralen Verkalkungen.

Ein Mechanismus, der es *T. gondii* ermöglicht im Wirtsorganismus zu überleben, ist die ungewöhnlich hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber freien Radikalen. Die wichtigste Quelle für freie Radikale bei der Abwehrreaktion des Wirtsorganismus ist Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Es wird beim sogenannten „respiratory burst“ von Makrophagen freigesetzt, diffundiert dann durch biologische Membranen und schädigt DNA, Lipide und Proteine durch Zerfall in Sauerstoffradikale. Außerdem entsteht (H_2O_2) auch bei normalen Stoffwechselforgängen in den Peroxisomen der Zelle.

Das Enzym Katalase (EC 1.11.1.6) wandelt zwei Wasserstoffperoxidmoleküle in Wasser und Sauerstoff um und eliminiert somit toxisches Wasserstoffperoxid. Katalase liegt zumeist in spezialisierten Zellorganellen, den Peroxisomen oder Microbodies, vor. Dort dient es zum Abbau von bei metabolischen Prozessen entstehendem Wasserstoffperoxid.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Katalase von *Toxoplasma gondii* kloniert und charakterisiert. Die Klonierung von *T. gondii* Katalase cDNA ergab ein Protein mit 502 Aminosäuren und einem errechneten Gewicht von 57.2 kDa mit starker Homologie zu anderen eukaryontischen Katalasen. Ein polyklonales Antiserum gegen ein GST-Fusionsprotein zeigte im Western-blot eine Bande bei ungefähr 63 kDa. Die Immunfluoreszenz zeigte ein vesikuläres Kompartiment im vorderen Ende des Parasiten. Dieses kann von anderen Zellorganellen (Mikronemen, Rhoptrien, Granula densa und dem Apikoplast) durch doppelte Immunfluoreszenzmarkierung unterschieden werden. Zytochemisch können Katalasen durch die DAB-Präzipitationstechnik nachgewiesen werden. Hier zeigten sich vesikuläre Strukturen vor dem Nukleus in der Lichtmikroskopie und runde, spezifische Präzipitate mit einem Durchmesser von 100 bis 300 nm in der Elektronenmikroskopie.

Am C-terminus der *T. gondii* Katalase findet sich ein „peroxisomales Targeting Signal“ (PTS1) in den letzten 3 Aminosäuren (-AKM). Die Expression der vollständigen Katalase in CHO-Zellen resultiert in einer peroxisomalen Lokalisation, während ein Konstrukt

ohne die letzten 3 Aminosäuren im Zytosol verbleibt. Wird das PTS1 mit einem Reporterprotein (Chloramphenicol-Acetyltransferase) fusioniert, wechselt dessen Lokalisation vom Zytosol zu den Peroxisomen. Damit wurde gezeigt, daß das PTS1 der *T. gondii* Katalase in einem heterologen System sowohl im Kontext der Katalase als auch eines Reporterproteins den Import in Peroxisomen vermitteln kann.

Diese Ergebnisse sind die ersten Hinweise auf Peroxisomen in einem Parasiten der Apikomplexa. Zugleich ist *T. gondii*, evolutionsbiologisch gesehen, der bisher niedrigste Eukaryont in dem bisher Peroxisomen nachgewiesen wurden.

6 Abkürzungsverzeichnis

5' RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
DAB	Diamino-Benzidin
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindol
DTT	Dithiothreitol
EST	Expressed Sequence Tag
FBS	Fetales Kälberserum
GST	Glutathion S-Transferase
IFA	Immunfluoreszenz Assay
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PTS	Peroxisomales Targeting Signal
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
T/S	Teorell-Stenhagen Puffer

Literatur

- [1] Ajioka JW. *Toxoplasma gondii*: ESTs and gene discovery. *Int J Parasitol*, 28(7): 1025–31, 1998.
- [2] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17): 3389–402, 1997.
- [3] Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, and Ricquier D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, 26(4): 435–9, 2000.
- [4] Bakker BM, Mensonides FI, Teusink B, van Hoek P, Michels PA, and Westerhoff HV. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(5): 2087–92, 2000.
- [5] Baudhuin P, Beaufay H, Rahman-Li Y, Sellinger OZ, Wattiaux R, Jacques P, and De Duve C. Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochem J*, 92(1): 179–84, 1964.
- [6] Bermudez LE RJ Covaro G. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect Immun*, 61(10): 4126–30, 1993.
- [7] Bicout DJ, Field MJ, Gouet P, and Jouve HM. Simulations of electron transfer in the NADPH-bound catalase from *Proteus mirabilis* PR. *Biochim Biophys Acta*, 1252(1): 172–6, 1995.
- [8] Blattner J, Helfert S, Michels P, and Clayton C. Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20): 11596–600, 1998.
- [9] Blattner J, Swinkels B, Dorsam H, Prospero T, Subramani S, and Clayton C. Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. *J Cell Biol*, 119(5): 1129–36, 1992.
- [10] Bock P, Kramar R, and Pavelka M. *Peroxisomes and related particles in animal tissues*. Springer-Verlag, Wien, New York, 1980.

- [11] Bogdan C and Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today*, 15(1): 22–8, 1999.
- [12] Butcher BA, Kim L, Johnson PF, and Denkers E. *Toxoplasma gondii* Tachyzoites Inhibit Proinflammatory Cytokine Induction in Infected Macrophages by Preventing Nuclear Translocation of the Transcription Factor NF-kappaB. *J Immunol*, 167(4): 2193–2201, 2001.
- [13] Carruthers VB and Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*, 31(2): 421–8, 1999.
- [14] Chang HR and Pechere JC. Macrophage oxidative metabolism and intracellular *Toxoplasma gondii*. *Microb Pathog*, 7(1): 37–44, 1989.
- [15] Christianson DW. Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Prog Biophys Mol Biol*, 67(2-3): 217–52, 1997.
- [16] Chudzik DM, Michels PA, de Walque S, and Hol WG. Structures of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases. *J Mol Biol*, 300(4): 697–707, 2000.
- [17] Coppens I, Sinai AP, and Joiner KA. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol*, 149(1): 167–80, 2000.
- [18] de Duve C and Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews*, 46: 323–357, 1966.
- [19] de Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, and Peeters JE. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol*, 29(8): 1269–87, 1999.
- [20] de Walque S, Kiel JA, Veenhuis M, Opperdoes FR, and Michels PA. Cloning and analysis of the PTS-1 receptor in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 104(1): 106–19, 1999.
- [21] Deimann W, Angermüller S, Stoward PJ, and Fahimi HD. Cytochemical methods for Peroxidases. In PJ Stoward and AG Everson Pearse, Herausgeber, *Histochemistry*, Band 3, Seiten 573–575. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1991.
- [22] Deimann W, Angermüller S, Stoward PJ, and Fahimi HD. Peroxidases. In PJ Stoward and AG Everson Pearse, Herausgeber, *Histochemistry*, Band 3, Seiten 135–159. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1991.

- [23] Ding M, Clayton C, and Soldati D. *Toxoplasma gondii* catalase: are there peroxisomes in toxoplasma? *J Cell Sci*, 113(Pt 13): 2409–19, 2000.
- [24] Dorset DL and Gilmore CJ. Direct methods in protein electron crystallography—beef liver catalase in its fully hydrated form at room temperature. *Acta Crystallogr A*, 55(Pt 3): 448–56, 1999.
- [25] Dotto GP, Horiuchi K, and Zinder ND. The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication. Its signals and domains. *J Mol Biol*, 172(4): 507–21, 1984.
- [26] Dubey J and Kreier JP. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis, and Other Tissue Cyst-Forming Coccidia of Man and Animals*, Band 3. Academic Press, NY, 1977.
- [27] Dubey JP. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J Am Vet Med Assoc*, 214(8): 1160–3, 1999.
- [28] Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol*, 6(1): 27–30, 1998.
- [29] Dubremetz JF, Achbarou A, Bermudes D, and Joiner KA. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res*, 79(5): 402–8, 1993.
- [30] Dubremetz JF and Schwartzman JD. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res Immunol*, 144(1): 31–3, 1993.
- [31] Dyer JM, McNew JA, and Goodman JM. The sorting sequence of the peroxisomal integral membrane protein PMP47 is contained within a short hydrophilic loop. *J Cell Biol*, 133(2): 269–80, 1996.
- [32] Frangioni JV and Neel BG. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S- transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem*, 210(1): 179–87, 1993.
- [33] Gouet P, Jouve HM, and Dideberg O. Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH. *J Mol Biol*, 249(5): 933–54, 1995.
- [34] Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, and Subramani S. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol*, 108(5): 1657–64, 1989.
- [35] Gould SJ, Krisans S, Keller GA, and Subramani S. Antibodies directed against the peroxisomal targeting signal of firefly luciferase recognize multiple mammalian peroxisomal proteins. *J Cell Biol*, 110(1): 27–34, 1990.

- [36] Guex N and Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15): 2714–23, 1997.
- [37] Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Kato A, Mano S, De Bellis L, Hayashi-Ishimaru Y, Yamaguchi K, Hayashi H, and M N. Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochem Biophys*, 32: 295–304, 2000.
- [38] Herold G. *Innere Medizin*. Herold, 2001.
- [39] Hillar A, Nicholls P, Switala J, and Loewen PC. NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and *Escherichia coli* enzymes. *Biochem J*, 300(Pt 2): 531–9, 1994.
- [40] Hughes HP, Boik RJ, Gerhardt SA, and Speer CA. Susceptibility of *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates and a new mathematical model for parasite killing. *J Parasitol*, 75(4): 489–97, 1989.
- [41] Janeway C and Travers P. *Immunobiology*. Current Biology Ltd., London, 2. Auflage, 1996.
- [42] Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, and Mellman I. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*, 249(4969): 641–6, 1990.
- [43] Jouve HM, Gouet P, Boudjada N, Buisson G, Kahn R, and Duee E. Crystallization and crystal packing of *Proteus mirabilis* PR catalase. *J Mol Biol*, 221(4): 1075–7, 1991.
- [44] Kaasch AJ and Joiner KA. Protein-targeting determinants in the secretory pathway of apicomplexan parasites. *Curr Opin Microbiol*, 3(4): 422–8, 2000.
- [45] Kaasch AJ and Joiner KA. Targeting and subcellular localization of *Toxoplasma gondii* catalase. Identification of peroxisomes in an apicomplexan parasite. *J Biol Chem*, 275(2): 1112–8, 2000.
- [46] Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, and Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem*, 274(20): 13908–14, 1999.
- [47] Ko TP, Safo MK, Musayev FN, Di Salvo ML, Wang C, Wu SH, and Abraham DJ. Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 56(Pt 2): 241–5, 2000.

- [48] Kunau WH and Erdmann R. Peroxisome biogenesis: back to the endoplasmic reticulum? *Curr Biol*, 8(9): R299–302, 1998.
- [49] Lazarow PB and Fujiki Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol*, 1: 489–530, 1985.
- [50] Leriche MA and Dubremetz JF. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol Res*, 76(7): 559–62, 1990.
- [51] Levine ND. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *J Protozool*, 35(4): 518–20, 1988.
- [52] Loewen P. Probing the structure of catalase HPII of *Escherichia coli*—a review. *Gene*, 179(1): 39–44, 1996.
- [53] Luder C, Walter W, Beuerle B, Maeurer M, and Gross U. *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): 1475–84, 2001.
- [54] Majno G and Joirs I. *Cells, Tissues, and Disease*. Blackwell Science, Cambridge MA, 1996.
- [55] Maniatis T, Sambrook J, and Fritsch E. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Band 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition Auflage, 1989.
- [56] McGonigle S, Dalton JP, and James ER. Peroxidoxins: A New Antioxidant Family. *Parasitology Today*, 14(4): 139–145, 1998.
- [57] Mehlhorn HE. *Parasitology in Focus*. Springer Verlag, Berlin, 1988.
- [58] Mehlotra RK. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Crit Rev Microbiol*, 22(4): 295–314, 1996.
- [59] Michels PA, Hannaert V, and Bringaud F. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today*, 16(11): 482–9, 2000.
- [60] Mordue DG, Desai N, Dustin M, and Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med*, 190(12): 1783–92, 1999.

- [61] Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, and Sibley LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol*, 92(2): 87–99, 1999.
- [62] Mui E, Samuel B, Mack D, Roberts C, Pope C, Roberts F, Trelease D, Milhous W, Kyle D, Tzipori S, and McLeod R. Isocitrate lyase and malate synthetase in *T. gondii*. In *5th Toxoplasma Conference*. Marshall, CA, 1999.
- [63] Mullen RT, Lee MS, Flynn CR, and Trelease RN. Diverse amino acid residues function within the type 1 peroxisomal targeting signal. Implications for the role of accessory residues upstream of the type 1 peroxisomal targeting signal. *Plant Physiol*, 115(3): 881–9, 1997.
- [64] Mullen RT, Lee MS, and Trelease RN. Identification of the peroxisomal targeting signal for cottonseed catalase. *Plant J*, 12(2): 313–22, 1997.
- [65] Murray HW. Cellular resistance to protozoal infection. *Annu Rev Med*, 37: 61–9, 1986.
- [66] Murray HW and Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. *J Exp Med*, 150(4): 938–49, 1979.
- [67] Murray HW and Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. III. Enhanced oxidative metabolism as an expression of macrophage activation. *J Exp Med*, 152(6): 1596–609, 1980.
- [68] Murray HW, Juangbhanich CW, Nathan CF, and Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *J Exp Med*, 150(4): 950–64, 1979.
- [69] Murray HW, Nathan CF, and Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. IV. Role of endogenous scavengers of oxygen intermediates. *J Exp Med*, 152(6): 1610–24, 1980.
- [70] Murthy MR, Reid TJD, Sicignano A, Tanaka N, and Rossmann MG. Structure of beef liver catalase. *J Mol Biol*, 152(2): 465–99, 1981.
- [71] Nash P, Purner M, Leon R, Clarke P, Duke R, and Curiel TJ. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol*, 160(4): 1824–30, 1998.

- [72] Nichols BA, Chiappino ML, and Pavesio CE. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*, 80(2): 91–8, 1994.
- [73] Nischnik N, Schade B, Dytnerka K, Dlugonska H, Reichmann G, and Fischer H. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes and Infection*, 3: 689–699, 2001.
- [74] Odberg-Ferragut C, Renault JP, Viscogliosi E, Tourselet C, Briche I, Engels A, Lepage G, Morgenstern-Badarau I, Camus D, Tomavo S, and Dive D. Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor characterisation of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 106(1): 121–9, 2000.
- [75] Ogata M. Acatlasemia. *Hum Genet*, 86(4): 331–40, 1991.
- [76] Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, and Misset O. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, 98(4): 1178–84, 1984.
- [77] Osumi T, Tsukamoto T, Hata S, Yokota S, Miura S, Fujiki Y, Hijikata M, Miyazawa S, and Hashimoto T. Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochem Biophys Res Commun*, 181(3): 947–54, 1991.
- [78] Parsons M, Furuya T, Pal S, and Kessler P. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol*, 115(1): 19–28, 2001.
- [79] Passreiter M, Anton M, Lay D, Frank R, Harter C, Wieland FT, Gorgas K, and Just WW. Peroxisome biogenesis: involvement of ARF and coatomer. *J Cell Biol*, 141(2): 373–83, 1998.
- [80] Peitsch MC. Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology*, 13: 658–660, 1995.
- [81] Peitsch MC. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans*, 24(1): 274–9, 1996.
- [82] Purdue PE and Lazarow PB. Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *J Cell Biol*, 134(4): 849–62, 1996.
- [83] Rapp S, Saffrich R, Anton M, Jakle U, Ansorge W, Gorgas K, and Just WW. Microtubule-based peroxisome movement. *J Cell Sci*, 109(Pt 4): 837–49, 1996.

- [84] Reddy and Janardan K. *Peroxisomes*. New York Acad. of Sciences, New York, 1996.
- [85] Reid TJD, Murthy MR, Sicignano A, Tanaka N, Musick WD, and Rossmann MG. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(8): 4767–71, 1981.
- [86] Rhodin J. *Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally changed Proximal Convolute Tubule Cells of the Mouse Kidney*. Aktiebolaget Godvil, Stockholm, 1954.
- [87] Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, and Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol*, 2(4): 426–32, 1999.
- [88] Roos DS, Donald RG, Morrissette NS, and Moulton AL. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol*, 45: 27–63, 1994.
- [89] Ruff MD. Important parasites in poultry production systems. *Vet Parasitol*, 84(3-4): 337–47, 1999.
- [90] Schwab JC, Beckers CJ, and Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2): 509–13, 1994.
- [91] Schwede T, Diemand A, Guex N, and Peitsch MC. Protein structure computing in the genomic era. *Res Microbiol*, 151(2): 107–12, 2000.
- [92] Shaw MK, Roos DS, and Tilney LG. Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 117(Pt 5): 435–43, 1998.
- [93] Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, and Huse WD. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res*, 16(15): 7583–600, 1988.
- [94] Sibley L, Hakansson S, and Carruthers V. Gliding Motility: An efficient mechanism for cell penetration. *Current Biology*, 8(1): R12–R14, 1998.
- [95] Sibley LD, Lawson R, and Weidner E. Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 19(1): 83–7, 1986.

- [96] Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, and Cesbron-Delauw MF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*, 108(Pt 4): 1669–77, 1995.
- [97] Sinai AP and Joiner KA. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol*, 51: 415–62, 1997.
- [98] Sinai AP and Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol*, 154(1): 95–108, 2001.
- [99] Sinai AP, Webster P, and Joiner KA. 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): 2117–28, 1997.
- [100] Soete M, Camus D, and Dubremetz JF. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp Parasitol*, 78(4): 361–70, 1994.
- [101] Sommer JM and Wang CC. Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*, 48: 105–38, 1994.
- [102] Son E, Song KJ, Shin JC, and Nam HW. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol*, 39(2): 133–41, 2001.
- [103] Subramani S. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev*, 78(1): 171–88, 1998.
- [104] Sumner JB and Dounce AL. Crystalline Catalase. *Science*, 124: 417–424, 1937.
- [105] Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, and Subramani S. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Embo J*, 10(11): 3255–62, 1991.
- [106] Swinkels BW, Gould SJ, and Subramani S. Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett*, 305(2): 133–6, 1992.
- [107] Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22): 4673–80, 1994.

- [108] Tielens AGM and Van Hellemond JJ. Differences in Energy metabolism Between Trypanosomatidae. *Parasitology Today*, 14(7): 265–271, 1998.
- [109] Titorenko VI, Chan H, and Rachubinski RA. Fusion of small peroxisomal vesicles in vitro reconstructs an early step in the in vivo multistep peroxisome assembly pathway of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol*, 148(1): 29–44, 2000.
- [110] Titorenko VI and Rachubinski RA. The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci*, 23(7): 231–3, 1998.
- [111] Titorenko VI and Rachubinski RA. Mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in protein exit from the endoplasmic reticulum are also defective in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Biol*, 18(5): 2789–803, 1998.
- [112] Walton PA, Hill PE, and Subramani S. Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol Biol Cell*, 6(6): 675–83, 1995.
- [113] Wan KL, Blackwell JM, and Ajioka JW. *Toxoplasma gondii* expressed sequence tags: insight into tachyzoite gene expression. *Mol Biochem Parasitol*, 75(2): 179–86, 1996.
- [114] Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, and Hess FA. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol*, 42(1): 68–91, 1969.
- [115] Wiemer EA, Wenzel T, Deerinck TJ, Ellisman MH, and Subramani S. Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. *J Cell Biol*, 136(1): 71–80, 1997.
- [116] Wiemer EAC, Luers GH, Faber KN, Wenzel T, Veenhuis M, and Subramani S. Isolation and characterization of Pas2p, a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome biogenesis in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem*, 271(31): 18973–80, 1996.
- [117] Yamamoto K and Fahimi HD. Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: evidence of interconnections between heterogeneous segments. *J Cell Biol*, 105(2): 713–22, 1987.
- [118] Zamocky M, Herzog C, Nykyri LM, and Koller F. Site-directed mutagenesis of the lower parts of the major substrate channel of yeast catalase A leads to highly increased peroxidatic activity. *FEBS Lett*, 367(3): 241–5, 1995.

[119] Zoeller RA and Raetz CR. Isolation of animal cell mutants deficient in plasmalogen biosynthesis and peroxisome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(14): 5170-4, 1986.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Keith Joiner von der Yale University Medical School, in dessen Labor der experimentelle Teil dieser Arbeit durchgeführt wurde, sowie allen Mitgliedern des Labors, insbesondere Dr. Heinrich Hoppe, Dr. Anthony Sinai, Dr. Verena Karsten, Dr. Timothy Stedman und Dr. Isabelle Coppens.

Herrn Prof. Dr. M. Frosch möchte ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die konstruktive Kritik danken.

Rottweil im Juli 2002, Achim Kaasch

Lebenslauf von Achim Kaasch

Geboren am 17.09.1973 in Fulda, Deutschland.

Ausbildung

- | | |
|---------------------------|--|
| 15.04.1993 | Abitur am Leibniz Gymnasium Rottweil. |
| 01.08.1993-
30.10.1994 | Zivildienst im stationären Pflegedienst des KKH Hiltrup. |
| 01.11.1994 | Beginn des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. |
| 01.08.1996 | Ärztliche Vorprüfung mit der Note „gut“. |
| 20.08.1997 | Erstes Staatsexamen mit der Note „gut“. |
| 01.09.1997-
31.03.1999 | Predoctoral Associate im Labor von Prof. Dr. K. Joiner, Infectious Diseases Section, Internal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven (USA). |
| 01.05.1999-
30.03.2000 | Hilfswissenschaftler im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Würzburg. |
| 29.03.2001 | Zweites Staatsexamen mit der Note „gut“. |
| 04.06.2002 | Drittes Staatsexamen mit der Note „sehr gut“. |

Klinische Ausbildung

- | | |
|---------------------------|--|
| 23.04.2001-
12.08.2001 | PJ-Tertial in der Neurologischen Uniklinik Würzburg. |
| 01.09.2001-
31.12.2001 | Chirurgisches PJ-Tertial im Kantonsspital Herisau (Schweiz). |

01.01.2002-
28.02.2002 Medizinisches PJ-Tertial im St. Lukes Hospital, Gwardamangia (Malta).

04.03.2002-
28.04.2002 Medizinisches PJ-Tertial am Clinical Center der National Institutes of Health, Bethesda (USA).

Studentische Aktivitäten

WS 1995 Studentischer Beirat im Uni-med Verlag.

WS 1996 Organisation des Kurses „Anatomie am Lebenden“.

WS 1996 Organisation einer biochemischen Seminarreihe für Medizinstudenten.

1999, 2000, 2001 Konzeption und Organisation des Promomed-Kongresses an der Universität Würzburg.

Stipendien und Preise

08/1997 FEBS Stipendium zur Teilnahme am Sommer-Kurs „Protein Targeting and Secretion“ in Cargèse, Korsika (Frankreich).

01.02.1998-
30.03.1999 Stipendium der Yale University Medical School zur Durchführung der Doktorarbeit.

seit 08/2000 Internet-Stipendium von „E-Fellows.net“.

11/2000 Preisträger beim Wettbewerb „CEO of the future“ von McKinsey & Co. und dem Manager Magazin.

Hiermit bestätige ich, dass obige Angaben richtig sind.

Achim Kaesch

Rottweil, Juni 2002