

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

**Cholesterinmetabolismus in *Toxoplasma gondii*:
Klonierung und Nachweis der Funktion eines
Acyl-CoA: Cholesterin Acyltransferase
ähnlichen Enzyms – ein neuer Angriffspunkt für
pharmakologische Intervention**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Friederike Susanne Quittnat
aus Pforzheim, Baden-Württemberg

Würzburg, Februar 2005

Referent: Professor Dr. med. M. Frosch

Koreferentin: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. habil. H. Moll

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2005

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Morphologie	1
1.1.3 Entwicklungszyklus	3
1.1.4 Transmission	4
1.1.5 Klinische Erscheinung	5
1.1.5.1 Immunkompetente Zwischenwirte	5
1.1.5.2 Immunsupprimierte Zwischenwirte	5
1.1.5.3 Pränatale oder konnatale Infektion	6
1.1.6 Diagnose	6
1.1.7 Therapie	6
1.1.8 Prophylaxe	7
1.2 Lipidmetabolismus	8
1.2.1 Cholesterin	8
1.2.2 Cholesterinquellen	8
1.2.2.1 Cholesterinbiosynthese	8
1.2.2.2 Cholesterinaufnahme	8
1.2.3 Lipidkörper	9
1.2.4 Acyl-CoA: Cholesterin Acyltransferase	9
1.2.5 Auswirkung hoher LDL-Spiegel auf Säugetiere	10
1.3 Der Lipidmetabolismus in <i>Toxoplasma gondii</i>	11
2. Hypothese	12
3. Materialien und Methoden	13
3.1 Materialien	13
3.1.1 Chemikalien und Antikörper	13
3.1.2 Zelllinien	13

3.2 Methoden	14
3.2.1 Zellbiologie	14
3.2.1.1 Zellkulturbedingungen	14
3.2.1.2 Parasitenreproduktion und –Reinigung	14
3.2.1.3 Bestimmung von Konzentration und Vermehrung von <i>T. gondii</i>	14
3.2.1.4 Selektion von stabilen <i>T. gondii</i> Mutanten-Stämmen, Mykophenolsäure – Selektion	15
3.2.2 Molekulargenetik	15
3.2.2.1 Isolierung der vollständigen <i>TgACAT</i> cDNA	15
3.2.2.2 DNA Konstrukte und deren Mutation	17
3.2.2.3 Transiente Transfektion von <i>T.gondii</i>	17
3.2.2.4 Transiente <i>TgACAT</i> -Expimierung in Säugetierzellen	18
3.2.3 Biochemie	18
3.2.3.1 Vitalitätstest von <i>T. gondii</i>	18
3.2.3.2 Proteinkonzentration-Bestimmung	19
3.2.3.3 Analyse von Proteinsequenzen	19
3.2.3.4 Analyse des Northern Blots	19
3.2.3.5 Gewinnung von frischem LDL (Zonale Dichtegradient-Ultrazentrifugation)	19
3.2.3.6 Radioaktiv markiertes frisches LDL	20
3.2.3.7 ACAT-Aktivitätsassay	20
3.2.3.8 Lipidextraktion aus Zellverbänden	21
3.2.3.9 Lipidanalyse	21
3.2.3.10 Messung der Cholesterinesterbiosynthese und Bestimmung der Inkorporation von radioaktivem Cholesterin oder Fettsäuren in Cholesterinester	21
3.2.3.11 Fixieren extrazellulärer Parasiten	22
3.2.3.12 Lipidstrukturerehaltende Fixierung	22
3.2.3.13 Färbung von Neutrallipiden	22

3.2.3.14	Immunfluoreszenz Analyse	23
3.2.4	Licht- und Elektronenmikroskopie	23
3.2.5	Statistische Auswertung	24
4.	Ergebnisse	25
4.1	<i>T. gondii</i> synthetisiert Cholesterinester aus verschiedenen Substraten	25
4.2	Variierende Lipoproteinkonzentrationen im Medium beeinflussen die Cholesterinestersynthese von <i>T. gondii</i>	25
4.3	Die cDNA des <i>TgACAT</i>	28
4.3.1	cDNA-Identifikation eines ACAT-verwandten Enzyms von <i>T. gondii</i>	28
4.3.2	Expression und Lokalisation des <i>TgACAT</i>	30
4.3.3	Die Funktion des <i>TgACAT</i>	31
4.4	Inhibitoren für Säuger-ACAT-1	32
4.4.1	Effekt von Inhibitoren auf die Aktivität der <i>TgACAT</i>	32
4.4.2	Wirkung der ACAT-Inhibitoren auf <i>T. gondii</i>	33
5.	Diskussion	35
6.	Zusammenfassung	39
7.	Abkürzungen	40
8.	Literaturverzeichnis	42
Anhang – Abbildungen		
Danksagungen		

1. Einleitung

1.1 *Toxoplasma gondii*

1.1.1 Epidemiologie

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) ist einer der am häufigsten weltweit vorkommenden humanpathogenen Parasiten aus der Familie der *Apikomplexa*. Neben dem Menschen ist er genauso pathogen für eine Vielfalt anderer Säugetiere.

Trotz variierender Meßmethoden, die sich in Sensitivität, Spezifität und Aussagewert unterscheiden, lassen sich in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen einzelner Kontinente vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Infektionszahlen erheben. Die Werte variieren dabei je nach Alter, kulturellen Lebensgewohnheiten und von außen wirkenden Umweltfaktoren. In den 90-iger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde in Zentraleuropa bei Frauen im gebärfähigen Alter über eine *T. gondii* - Durchseuchung von 37 bis 58% (Aspöck und Pollak, 1992; Foulon et al., 1994; Krauß et al., 1993) berichtet. In westafrikanischen Ländern zeigten sich Werte zwischen 54 und 77%, in Südostasien zwischen 4 und 39% (Tenter et al., 2000). Mit dem Lebensalter nimmt die Durchseuchung der Bevölkerung mit *T. gondii* proportional zu (Seitz und Maier, 1994).

1.1.2 Morphologie

Die Erstbeschreibung des Parasiten *Toxoplasma gondii* fiel auf den Beginn des letzten Jahrhunderts (Ashburn, 1992). Zuerst in Säugetieren und Vögeln beschrieben, wurde 1908 ein Zusammenhang zwischen dem in Säugetieren lebenden Parasiten und den im Menschen beobachteten parasitären Gewebszysten gesehen (Nicolle und Manceaux, 1908). Erst in den 1960-iger Jahren war es möglich, die Zusammenhänge von Gamet, Oozyste und Sporozoit im heterogenen Lebenszyklus von *T. gondii* zu erfassen.

T. gondii ist ein obligat intrazellulär lebender Protozoe, der in einer Vielfalt von Säugetieren gefunden wird. Er gehört zu der Gruppe der *Apicomplexa*, zu denen auch die *Plasmodium* Spezies (Verursacher von Malaria) gehören, sowie ungefähr 5000 andere Spezies, die nur in Ansätzen erforscht sind (Levine, 1988).

T. gondii erhielt seinen Namen durch die bananenähnliche, leicht gebogene Form seines Körpers (*toxon* [gr.] = Bogen). Er mißt 6 - 8 µm in Länge und 2 - 4 µm im Durchmesser und ist somit kleiner als eine typische Säugetierzelle (vergleichsweise fänden bis zu 64 einzelne *T. gondii* im Nukleus einer Säugerzelle Platz). Ein Ende des Parasiten spitzt sich zu einer kurzen Nase zu, so daß der Parasit von außen einen polaren Aspekt erhält, und ein vorderer von einem hinteren Teil zu unterscheiden sind. Das Zytoplasma dieses nasenförmigen Membranauszugs enthält den apikalen Komplex (eine Ansammlung von sekretorischen Organellen), der den *Apicomplexa* ihren Namen gibt.

Neben dem Nukleus, der die Zelle in ein anteriores und ein posteriores Kompartiment teilt, findet sich ein einzelnes Mitochondrium. Das Endoplasmatische Retikulum (ER) umgibt den perinukleären Raum und verteilt sich sonst vermehrt im hinteren Anteil der Zelle, während der Golgi-Apparat (3-5 Sacculi (Pelletier et al., 2002)), mit dazugehörigem Fusions-Apparat (Ajioka et al., 1998; Hoppe and Joiner, 2000; Liendo et al., 2001) sich vor dem Nukleus befindet. Zu den den *Apicomplexa* eigenen sekretorischen Organellen zählen neben den sogenannten „dense granules“ die Rhoptrien und Mikronemen. Die Rhoptrien liegen als lang gestreckte sackartige Gebilde im anterioren Anteil der Zelle und enden in dem nasenförmigen Membranauszug, wo sie im engen Kontakt mit der Plasmamembran stehen. Die Mikronemen sind um die Rhoptrien herum verteilt. Durch Exozytose der gespeicherten Mikronem-Proteine erfolgt die Bindung des extrazellulären Parasiten an die Zellmembran (Carruthers und Sibley, 1997; Joiner und Roos, 2002). Während des Eindringens in die Wirtszelle sezernieren die Rhoptrien wiederum ihre gespeicherten Proteine, um zusammen mit anderen Exozytosevorgängen die parasitäre Vakuole (PV) zu bilden. Über das gesamte Zytoplasma verteilt zeigen sich „dense granules“. Als Äquivalent dazu können die reifen sekretorischen Organellen in endokrinen, neuroendokrinen oder exokrinen Säugetierzellen gesehen werden. Sie sind mit an der

intrazellulären Replikation und an der Bildung der parasitophoren Vakuole beteiligt (Joiner und Roos, 2002; Mordue et al., 1999).

Ein weiteres Organell, das apikal in *T. gondii* liegt, ist das Kinetochor. Es hat tubuläre Strukturen, die ähnlich einem Regenschirmgestänge entlang der Zellmembran verlaufen und die äußere Form *T. gondii* stabilisieren. Es zeigt sich außerdem noch der Apikoplast, ein Relikt, ähnlich den Chloroplasten oder Chromoplasten, die in Pflanzenzellen gefunden werden können (im Vergleich zu diesen Organellen ist der Apikoplast von mindestens 3 Membranen umgeben). Die Aufgabe des Apikoplasts konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden (Aries und Kurowski, 2001; Bogorad et al., 1989; Seitz und Maier, 1994). (Abb. 1).

1.1.3 Entwicklungszyklus

Endwirt von *T. gondii* sind die Mitglieder der Familie der *Felidae*, in unseren Breitengraden hauptsächlich die Hauskatze. Als Zwischenwirt gelten so gut wie alle anderen Säugetiere - auch Delphine - und einzelne Vogelarten (Dubey und Beattie, 1988). Der normalerweise in den Enterozyten der Katze lebende Säugetierparasit nimmt eben da eine geschlechtsspezifische Form an; es bilden sich die diploiden Gameten. Nach Befruchtung des weiblichen Gamet wird dieser als Oozyste mit dem Fäzes ausgeschieden und entwickelt nach einigen Tagen als Sporozyste seine hohe Infektiosität. Eine Oozyste enthält zwei Sporozysten, welche wiederum vier Sporozysten beherbergen (Remington, 1990).

In den Zwischenwirt aufgenommen, geht der Sporozoit in den Tachyzoit über. Beide verfügen über einen haploiden Chromosomensatz. Beim Eindringen von *T. gondii* in die Wirtszelle bildet sich um den Parasiten eine zweilagige Membran, die parasitophore Vakuole (PV), in der der Parasit geschützt und abgeschirmt lebt. Da die PV keine antigenen Eigenschaften besitzt, kann der Organismus sie nicht als „fremd“ erkennen und ermöglicht *T. gondii* ungehindert im Zwischenwirt zu persistieren.

T. gondii vermehrt sich ungeschlechtlich durch Endodyogenie. Erreichen die Tochterzellen eine bestimmte Größe, lysiert die Plasmamembran der Mutterzelle und setzt die Tochterzellen frei. Als Tachyzoit dauert ein Replikationszyklus unter Idealbedingungen 6-10 Stunden. Nach wenigen Tagen hat sich die Anzahl der

Tachyzoiten in einer PV ver Hundertfacht, so daß das Zytoplasma der Wirtszelle erst verdrängt wird, später die Zellmembran dem Druck der PV nicht mehr standhalten kann und lysiert. Es kommt zur Parasitämie.

Da *T. gondii* obligat intrazellulär lebt (mit Ausnahme des Sporozoiten), muß es in eine neue Zelle eindringen und eine PV um sich bilden. Dort beginnt er von neuem mit der endodyogenen Replikation. Der Parasit kann in allen Geweben des Wirts angesiedelt sein; hauptsächlich befällt er allerdings das Zentralnervensystem, den Augenhintergrund oder die Skelettmuskulatur.

Als Bradyzoit befinden sich die Parasiten im Dauerstadium. Der Bradyzoit selbst repliziert sich nur sehr langsam, so daß die Wirtszelle sich an die wachsende Größe der PV anpassen kann. Erst bei sehr hoher Parasitenzahl kommt es daher zur Zerstörung der PV und der Wirtszelle. (Abb. 2).

1.1.4 Transmission

Es gibt drei infektiöse Stadien im Lebenszyklus des Parasiten, den sich schnell replizierenden Tachyzoit, den in Gewebssystemen ruhenden Bradyzoit und der Sporozoit, der in der sporulierten Oozyste zu finden ist. Man spricht von einer horizontalen Infektion, wenn der Parasit oral aufgenommen wird. Der infektiöse Parasit liegt entweder in Form einer Oozyste vor (wie sie in der Katze oder deren Fäzes zu finden ist), oder als Bradyzoit, der in rohem oder nur unzureichend durchgebratenem Fleisch eines befallenen Zwischenwirts persistiert. Nach Ingestion durchwandert der Parasit die Darmwand und befällt zuerst hauptsächlich das Retikuloendotheliale System (RES); das saure Milieu des Magens spielt dabei in der Abwehr gegenüber *T. gondii* keine Rolle, da die Parasitenmembran säurefest ist (Boothroyd, 1993; Dubey, 1991). Auch im RES entgeht der Parasit der unspezifischen immunologischen Abwehr des Zwischenwirts, da es zwischen Parasiten und Wirtszelle zu keiner Fusion von Vesikeln kommen kann (Joiner et al., 1990) also auch nicht zur Fusion von toxischen Lysosomen und PV.

1.1.5 Klinische Erscheinung

1.1.5.1 Immunkompetente Zwischenwirte

Bei Gesunden ruft eine Erstinfektion mit *T. gondii* eine kaum zu bemerkende Reaktion hervor, häufig bleibt die Transmission ganz unbemerkt.

Ein unspezifisches Krankheitsgefühl mit Müdigkeit, Muskelschmerzen, Fieber bis 39°C und generalisierte Lymphadenopathie oder lokale zervikale Lymphknotenschwellung können eine Reaktion des Körpers auf die Infektion sein (Belohradsky und Speer, 2000; Aries und Kurowski, 2001). Diese tritt meist zum Zeitpunkt der ersten Parasitämie auf, wenn die aus dem Gastrointestinaltrakt in das RES aufgenommenen Parasiten aus den Makrophagen lysieren. In dieser Parasitämiephase erfolgt bei gesunden Zwischenwirten die Bildung von Antikörpern gegen den Parasiten. Immunkompetente Zwischenwirte verhindern über die Antikörperbildung die Ausbreitung von *T. gondii* im Organismus, wenn es zu einer erneuten Lyse der Zellen und somit zu einer Parasitämie gekommen ist. Daraufhin treten Parasitämien nicht mehr auf. Ein *in vivo* bisher unbekannter Mechanismus, der eng mit der Immunkompetenz zusammenhängt, veranlaßt den Parasiten, sich zum Bradyzoit zu differenzieren und als latente Infektion im Organismus zu persistieren, ohne daß es zur erneuten Parasitämie kommt. Freie *T. gondii*, die mit Antikörpern opsoniert wurden, werden von den Makrophagen erkannt und eliminiert (Joiner et al., 1990).

1.1.5.2 Immunsupprimierte Zwischenwirte

Kommt es zu einer Erstinfektion eines Immugeschwächten (z. B. durch eine konsumierende Erkrankung wie HIV / AIDS), bricht die Toxoplasmose ungehindert aus (Leport und Remington, 1992). Dabei bleibt die tachyzoite Form des Parasiten erhalten. Ungehindert setzt *T. gondii* die Replikation fort. Erneute Rupturen der Wirtszellen und Parasitämien, sowie abszedierende parasitäre Infiltrationen im gesamten Organismus sind die Folge, sowie der konsekutive Tod des Patienten durch Multiorganversagen (Luft und Remington, 1992).

Bei medikamentöser Immunsuppression (z.B. nach Organtransplantationen, bei Autoimmunaggression oder Therapien mit Zytostatika bei Malignomen) des einstmalig

gesunden Zwischenwirts oder durch eine schwere Erkrankung, kann sich die Immunkompetenz so weit verringern, daß es zu einer raschen Vergrößerung der bereits im Gewebe befindlichen persistierenden *T. gondii* Zyste kommt. Reaktivierung der Bradyzoiten und Überführung in die tachyzoite Form führt zu der oben beschriebenen Durchsetzung des Organismus mit *T. gondii*.

1.1.5.3 Pränatale oder konnatale Infektion

Eine Sonderform stellt die kongenitale Infektion mit *T. gondii* dar. Es handelt sich dabei um eine vertikale Transmission von Tachyzoiten des Parasiten.

Fehlt die Immunkompetenz gegen *T. gondii* bei Erstinfektion der Mutter, kann der Parasit diaplazentar in 40% aller Fälle auf den Fötus übertragen werden. Infektionen in einer frühen Gestationswoche gehen häufig mit intrauterinem Fruchttod einher. Während die Mutter keine oder nur unspezifische Symptomatik (siehe oben) zeigt, stellen sich beim Fötus schwere bleibende Schäden ein. Das klassische Trias des Neugeborenen zeigt sich nur bei Vollausrprägung der Toxoplasmose mit Hydrocephalus internus, intrazerebralen Verkalkungen und Chorioretinitis (Boothroyd, 1993; Dubey, 1991; Dubey et al., 1998; Remington, 1990).

1.1.6 Diagnose

Die Diagnose der Toxoplasmose erfolgt über die Serologie (Sabin-Feldmann-Test, Komplementbindungsreaktion, indirekter Immunfluoreszenztest) oder bei symptomatischem Verlauf über direkten Erregernachweis (Mikroskopie, Antigennachweis, DNA-Amplifikation, Tierversuch) (Belohradsky und Speer, 2000; Aries und Kurowski, 2001; Seitz und Maier, 1994).

1.1.7 Therapie

Die momentane Standardtherapie erreicht nur das Tachyzoiten-Stadium, die sich schnell replizierende Form von *T. gondii*, da hauptsächlich Folsäure-Antimetaboliten (Pyrimethamin / Sulfadiazin) eingesetzt werden. Die Wirksamkeit der Therapie beträgt

im Mittel 70 - 80%, dabei ist mit vielfältigen Nebenwirkungen zu rechnen. Bei Auftreten von Knochenmarksdysfunktion und -suppression, Überempfindlichkeitsreaktionen und / oder Leberfunktionsstörungen (40 - 70%) muß der Behandelnde eines der Medikamente oder beide absetzen und auf alternative Mittel wie Clindamycin oder Clarithromycin zurückgreifen. Diese können wiederum (besonders in Kombination mit Pyrimethamin) zu anderen Nebenwirkungen führen (Coppens et al., 2000).

Nach den derzeitigen Richtlinien werden nichtsymptomatische Infektionen bei Gesunden nicht therapiert, da die Therapie die persistierenden Zysten nicht erreicht, also eine Eradikation nicht zu erwarten ist.

Immunkompetente, symptomatisch Erkrankte erhalten solange eine chemotherapeutische Therapie, bis sie klinisch gesundet und die Antikörpertiter rückläufig sind. Ebenso wird bei Immunsupprimierten mit aktiver Infektion verfahren. Chemoprophylaxe wird bei Seropositiven mit zu erwartender Immunsuppression ein Leben lang angewendet.

Primärinfizierte Schwangere werden anstelle der sonst angewandten synergistisch wirkenden Folsäuremetabolismus-Antagonisten (Pyrimethamin und Sulfonamid) mit einem plazentagängigen Makrolid (Spiramycin) zum Schutz des Fötus behandelt (Belohradsky und Speer, 2000; Aries und Kurowski, 2001).

1.1.8 Prophylaxe

Da die Transmission hauptsächlich über den Genuß von rohem Fleisch erfolgt oder durch engen Kontakt mit Katzen, wird besonders Patienten einer Risikogruppe (mit konsumierenden Erkrankungen, immunsupprimiert oder zu erwartende Immunsuppression) und Schwangeren ohne vorheriger Infektion mit *T. gondii* geraten, nur gut durchgebratenes Fleisch zu sich zu nehmen und Kontakt mit Katzen zu vermeiden, oder sich nach Kontakt gründlich zu reinigen.

1.2 Der Lipidmetabolismus

1.2.1 Cholesterin

Cholesterin ist ein hydrophobes, sterisches Molekül, das durch die Hydroxylgruppe an Kohlenstoff C(3) und seiner aliphatischen Seitenkette von 8-10 Kohlenstoffatomen an C(17) zu der Gruppe der Sterole gehört (Abb. 3). Das zusammengesetzte Ringsystem verleiht Membranen eine höhere Rigidität als andere Lipide und ist somit ein wichtiger Determinant der Membranform.

In höheren Eukaryoten ist die Cholesterinhomöostase minutiös durch transkriptionelle, translationelle und posttranslationelle Mechanismen reguliert (Brown und Goldstein, 1999; Goldstein und Brown, 1990; Lange et al., 1996), wobei die Zelle Cholesterin aus verschiedenen Quellen bezieht (Olivier und Krisans, 2000).

1.2.2. Cholesterinquellen

1.2.2.1 Cholesterinbiosynthese

Eine Quelle des Cholesterins ist die *de novo* Biosynthese über den Mevalonat-Zyklus, die im ER erfolgt (wichtigstes Enzym dieses Weges ist die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase). Das neu synthetisierte, schwach polare Cholesterin wird „schützend“ von Caveolinproteinen, die sich im Zytoplasma befinden, umgeben. Caveolin ist das Transportmedium des Cholesterins zu den Caveolae (Lipidomänen in der Plasmamembran) der Plasmamembran. In der Plasmamembran angekommen wird das Cholesterin in die zellulären Vorgänge mit einbezogen (Lange et al., 1996; Liscum und Munn, 1999).

1.2.2.2 Cholesterinaufnahme

Eine weitere Möglichkeit der Säugetierzelle an freies Cholesterin zu kommen stellt das Low-Density Lipoprotein (LDL) dar. Das sich im Blutplasma befindliche LDL enthält im Kern freies Cholesterin. Über spezifische membranständige Rezeptoren wird das

LDL mit Cholesterin endozytiert und von reifen Endosomen oder Lysosomen hydrolysiert (Lange et al., 1997). Einmal von den Lysosomen freigesetzt, wird ein Teil des Cholesterins wieder zur Plasmamembran transportiert. Über Vesikel gelangt der verbleibende Cholesterinanteil zum ER.

1.2.3 Lipidkörper

Eine andere Quelle des Cholesterins sind die Lipidspeicher der Zelle: die Fetttropfen, Lipidkörper oder Neutrallipide im Zytoplasma. Sie liegen in unmittelbarer Nähe des ER, sind von einer Membran umgeben und variieren stark in ihrer Größe. Bei Bedarf werden die sich in Form von Cholesterinestern in den Lipidtropfen befindlichen Speicher des Cholesterin von einer ER-ständigen Esterase hydrolysiert und wieder zur Plasmamembran transportiert (Lange et al., 1996; Liscum und Munn, 1999). Andererseits wird überflüssiges zelluläres Cholesterin an seiner Hydroxylgruppe von C(3) vom ER aus mit Fettsäuren verestert und als Cholesterinester in die Lipidkörper verbracht. Cholesterin ist in einer Membran nicht als statisches Element zu sehen. Ständig findet ein Umsatz von Cholesterin statt, bei dem in einen Komplex eingebundenes Cholesterin aus der Formation der Membran herausgelöst und zu einer anderen Lokalisation transportiert wird. Im Durchschnitt beträgt die Verweildauer eines Cholesterin-Moleküls in der Zellmembran 1-2 Stunden (Brasaemle et al., 2000; Phillips et al., 1987) (Abb. 3).

1.2.4 Acyl-CoA:Cholesterin Acyltransferase

Für die Veresterung von Cholesterin und Fettsäuren und damit zur Bildung von polaren Cholesterinestern ist die Acyl-CoA:Cholesterin Acyltransferase (ACAT) zuständig. Sie benötigt für diese energetisch unvorteilhafte Reaktion ATP und Acyl-CoA, oder anstelle von ATP und Acyl-CoA, schon mit Acyl-CoA aktivierte Fettsäuren.

Im Säugetierorganismus existieren zwei ACAT Enzyme (ACAT-1 und ACAT-2), zwei von verschiedenen Genen kodierte Proteine mit hypothetisch unterschiedlichen Funktionen (Joyce et al., 2000). ACAT-1 kommt ubiquitär in allen Zellen des

Organismus höherer Eukaryoten vor, in Nieren- und Nebennierengewebe und Makrophagen sind sie besonders zahlreich. ACAT-2 ist hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt, den Mukosazellen und den Hepatozyten zu finden (Lee et al., 2000). Beide Enzyme liegen jeweils in mehreren Kopien in den Zellen vor. Neben der Gewebsverteilung unterscheiden sie sich durch Variationen in der Transmembrantopologie. Die putativen Bindungsstellen für Cholesterin und Fettsäuren beider Enzyme kommen dadurch in unterschiedlichen Stellungen zueinander im Zytoplasma und im ER-Lumen zu liegen.

Auch wenn sich beide Enzyme sehr ähnlich sind und sie vergleichbaren Regulationsmechanismen unterliegen, beschränkt sich diese Arbeit auf Vergleiche mit der ubiquitär vorkommenden Acyl-CoA: Cholesterin Acyltransferase-1.

Die ACAT-1 ist ein ER-gebundenes Enzym, mit je nach Organismus unterschiedlich vielen Transmembrandomänen. Das Enzym wird allosterisch von Cholesterin gesteuert. Bei Überschuss reguliert Cholesterin im ER die enzymatische Reaktion hoch, genauso hat es aber auch über unbekannte Mechanismen auf die transkriptionelle, translationelle und posttranslationelle Expression des Enzyms Einfluss (Chang et al., 1995; Chang et al., 1997; Cheng et al., 1995; Li et al., 1999).

1.2.5 Auswirkung hoher LDL-Spiegel auf Säugetiere

Hohe LDL-Spiegel stehen in engem Zusammenhang mit der Entwicklung von Arteriosklerose, die das Lumen von Gefäßen einengt, und gleichzeitig die Gefäßwand erstarren läßt. Diese Veränderungen lassen nur noch eine eingeschränkte Pulsation des Gefäßes zu und limitieren dessen Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Blutdrücke. Die Regulationsfähigkeit des Gefäßes nimmt ab, so daß die eigentliche Funktion - eine kontinuierliche Perfusion von Organen und dem gesamten Organismus unter groß-amplitudigen Blutdruckschwankungen - nicht mehr gegeben ist. So führen hohe LDL-Spiegel über die Arteriosklerose zu erhöhtem Blutdruck, verstärkter Thrombosenbildung durch Wandunregelmäßigkeiten und Organinfarktanfälligkeit.

Der Pathomechanismus bei Überangebot von Cholesterin und freien Fettsäuren aus dem Blut besteht in der ungehemmten Anhäufung von Cholesterinestern in Neutrallipiden im Zytoplasma.

Das LDL wird in die Zelle aufgenommen und in Lysosomen in seine Bestandteile (Cholesterin, Fettsäuren, Lipoproteine und Phospholipide) zerlegt und die Lipide in der Zelle zum Großteil verstoffwechselt - oder bei Überschuß gespeichert. Dabei wird nicht nur die Funktion der ACAT durch Cholesterin im Menschen hochreguliert, es finden sich auch höhere Expressionsniveaus des Enzyms in der betroffenen Zelle (Chang et al., 1995; Chang et al., 1997).

1.3 Der Lipidmetabolismus in *T. gondii*

Ein Grund, weshalb *T. gondii* obligatorisch intrazellulär lebt, ist die Auxotrophie des Parasiten zu Cholesterin. Auxotroph für diesen Metaboliten zu sein bedeutet, daß keine Sterole synthetisiert werden können (weder über den Mevalonatweg wie in Eukaryoten üblich, noch über alternative Mechanismen), der Organismus aber ohne diese Substrate nicht überleben kann (Coppens et al., 2000).

Schon früher wurde nachgewiesen, daß die Membranen von *T. gondii* Strukturen enthalten, die den morphologischen und biochemischen Kriterien von Cholesterin entsprechen (Cintra und de Souza, 1985; Foussard et al., 1991a; Foussard et al., 1991b; Gallois et al., 1988). Hauptsächlich kommt Cholesterin in der Plasmamembran des Parasiten und in der apikalen Region vor; dort besonders in den *Apicomplexa* eigenen sekretorischen Rhoptrien. In der parasitären Vakuole hingegen ist der Cholesteringehalt vergleichsweise gering.

Über welchen Weg der Parasit das Cholesterin erhält, ist bisher nicht geklärt.

Genauso wie in Säugetierzellen finden sich auch im *T. gondii* Fetttropfen im Zytoplasma, die Lipidkörper oder auch Neutrallipide genannt werden. Sie sind bei normalen Wachstumsbedingungen in den Tachyzoiten besonders in der hinteren Hälfte des Parasiten angereichert, in räumlicher Nähe zum ER. Neben Phospholipiden bestehen sie zum Großteil aus Cholesterin, das mit Fettsäuren verestert ist (Coppens et al., 2000).

2. Hypothese

Vergleicht man die Organellen von Säugetierzellen und *T. gondii*, zeigt sich, daß *T. gondii* zwar über einige zusätzliche Organellen verfügt, neben diesen finden sich aber auch die grundlegenden Organellen, die den Stoffwechsel einer eukaryoten Zelle ausmachen. In Säugetierzellen ist die Cholesterinhomöostase im Zytoplasma durch differenzierte Mechanismen geregelt.

Wird *T. gondii* als Modell benutzt, um auf Vorgänge in Säugetierzellen zu schließen (Pelletier et al., 2002; Hu et al., 2002), muß von einer Parallelität im Metabolismus beider Systeme ausgegangen werden. Dementsprechend sollte es auch möglich sein, Parallelen im Lipidmetabolismus von *T. gondii* zu der durch differenzierte Mechanismen geregelten Cholesterinhomöostase im Zytoplasma von Säugetierzellen zu finden.

Zu Beginn dieser Arbeit möchte ich aufgrund von Beobachtungen von *T. gondii* folgende Behauptungen aufstellen:

- In *T. gondii* findet man eine sich verändernde Anzahl von Lipidtropfen im Zytoplasma, ein Grund ist die Reaktion des Parasiten auf das extrazelluläre Angebot an LDL und somit von Cholesterin.
- Die Lebensfähigkeit des Parasiten und seine Replikationsgeschwindigkeit ist abhängig von dem Angebot an freiem Cholesterin der extrazellulären Matrix, der Wirtszelle, sowie der Mobilität des Cholesterin innerhalb von *T. gondii*.
- Da es bisher keinen Nachweis gibt, daß Lipidtropfen endo- oder exozytiert werden, nehme ich an, daß auch *T. gondii* über einen Mechanismus verfügt, eigene Lipidtropfen zu synthetisieren. Dieser Mechanismus ist in einem der Funktion nach dem Säugetier ähnlichen ACAT-Enzym zu suchen.
- Wird das potentielle Enzym in seiner Funktion gehemmt, wird die Cholesterinhomöostase innerhalb des Parasiten gestört, was zu einem Funktionsverlust der Organellen führt und damit die Vitalität des Parasiten einschränkt.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Antikörper – Alle Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO) oder Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN) bezogen, sofern sie nicht gesondert aufgeführt werden.

Die bei der Dünnschichtchromatographie (TLC) verwendeten Lösungsmittel und Standardkontrollen waren von höchst möglichem Reinheitsgrad (highest purity level; HPL). Mit Silikatgel beschichtete Dünnschicht-Chromatographieplatten (Silica gel 60 TLC plates) wurden von EM Science, Gibbstown, NJ bezogen.

Von Amersham Corp. (Arlington Heights, IL) wurden die zur radioaktiven Markierung benötigten Reagenzien erworben: [1,2-³H]Cholesterin, [9,10-³H]Ölsäure (Oleat), 3-Phosphatidylcholin, 1,2-di[1-¹⁴C]Oleyl und [5,6-³H]Uracil.

Die ACAT-1-Inhibitoren CI-976 und DuP-128 wurden von Dr. Annabelle Rodriguez (John Hopkins University, Baltimore) bezogen.

Antikörper, die in diesen Experimenten benutzt wurden, waren Maus Anti-HA (Babco, Richmond, CA) und Ziege-Anti-Maus-FITC (Babco, Richmond, CA).

3.1.2 Zell-Linien – Für die Studien wurden folgende Säugetier-Zell-Linien verwendet: primäre HFF-humane Vorhaut Fibroblasten (ATCC CRL-1635), CHO-chinesische Hamster Ovarial-Zellen (ATCC CCL-163). AC29, Zellen, die keine Cholesterinester *de novo* bilden können (Cadigan et al., 1988), wurden von Dr. Ta-Yuan Chang (Dartmouth Medical School, Hanover) bezogen, MEF +/+ ACAT und MEF -/- ACAT Zellen (Murine embryonale Fibroblasten, mit doppelter Knock-out des ACAT-1-gens) von Robert V. Farese jr. (Gladstone Foundation for Cardiovascular Research and University of California, San Francisco, California).

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologie

3.2.1.1 Zellkulturbedingungen – Alle Zelllinien wurden als „Monolayer“ unter einer Atmosphäre aus 5% CO₂, bei 37°C gezogen. Für HFF, MEF und CHO Zellen verwendete ich α -Minimum Essential Medium (von der Media Core Facility des Department of Cell Biology, Yale University zubereitet), dem 2 mM L-Glutamin und Penicillin/ Streptomycin (100 U/ ml auf 100 μ g/ ml) und 10% (vol/ vol) fetales Rinderserum (FBS) zugefügt wurden. AC29 Zellen wurden in F-12 Medium (Life Technologies, Inc.) mit 10% FBS und Gentamycin 10 μ g/ ml kultiviert.

Um die Zellen aus dem Monolayer zu lösen wurden sie mit Trypsin/ EDTA behandelt (1 –2 Minuten (min.)) und solange inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Mit Zugabe von Standardmedium wurde die Reaktion beendet.

3.2.1.2 Parasitenreproduktion und –Reinigung – Während der gesamten Studie verwendete ich die tachyzoite Form des RH Stammes von *Toxoplasma gondii*, die *in vitro* durch kontinuierliche Infektion und Re-Infektion von HFF-Monolayern vermehrt wurde, wie beschrieben (Roos et al., 1994). Zur Aufreinigung der Parasiten wurde der Monolayer vorsichtig von dem jeweiligen Behältnis mit einem sterilen Spatel abgekratzt und mitsamt Medium zweimalig durch eine 27-gauge Nadel passiert, um kontaminierende Wirtszellen zu lysieren, und dreimal mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) durch jeweils 10-minütige Zentrifugation bei 1000 g in einer GPR Tischzentrifuge (Beckman Instruments, Inc.) gewaschen.

3.2.1.3 Bestimmung von Konzentration und Vermehrung von *T. gondii* – Zur Bestimmung der Parasitenkonzentration wurde das sich im Zentrifugierungsvorgang bildende Pellet in Medium oder PBS resuspendiert, je nach Größe des Pellets um ein Vielfaches verdünnt und in einer Hausser Zählkammer unter 40-facher Vergrößerung ausgezählt.

Die Vermehrungsfähigkeit der Parasiten wurde zum einen per Hand ausgezählt: Parasiten/ Vakuole/ 500 Vakuolen im Vergleich zu Parasitenkulturen, die unter Standardbedingungen gewachsen waren.

3.2.1.4 Selektion von stabilen *T. gondii* Mutanten-Stämmen, Mykophenolsäure-Selektion

– Die Vorbereitung dieses Versuches erfolgte wie unter 3.2.2.3 beschrieben. Anstelle des wildtypischen Parasiten wurden Δ HXGRPNSFHA eingesetzt. Diesem Stamm fehlt die Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase, so daß seine Parasiten nicht fähig sind, selbständig Nukleotide zu synthetisieren (Roos et al., 1994). Als Selektionsmedium wurde α -MEM8 (aus Media Core Facility des Departments of Cell Biology, Yale University zubereitet) mit 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (100 U/ ml auf 100 μ g/ ml) verwendet, dem FBS, HEPES, L-Glutamin, MPA (Mykophenolsäure) und Xanthin zu einer endgültigen Konzentration von 8%, 10 mM, 2 mM, 25 μ g/ ml (Stockkonzentration 25 mg/ ml in 100% Ethanol), 50 μ g/ ml (Stockkonzentration 25 mg/ ml in 0,3 M NaOH) zugesetzt wurden. Weiterhin wurden 96-Kammer-Kulturplatten mit HFF Zellen verwendet, deren Standardmedium 3 Tage zuvor gegen α -MEM8 ausgetauscht wurde.

Die Transfektion der Parasiten erfolgte wie unter 3.2.2.3 beschrieben. Nach einer Selektionsphase von 14 Tagen (d) in Selektionsmedium wurden die ersten IFA Proben durchgeführt.

3.2.2 Molekulargenetik

3.2.2.1 Isolation der vollständigen *Tg*ACAT cDNA – *T. gondii* RNA wurde mit Trizol Reagenz (Gibco-BRL, Grand Island, NY) isoliert. Um daraus eine cDNA-Bibliothek zu gewinnen, wurde, zuerst mit Hilfe des *GeneRacer* Kit (Invitrogen) und entsprechend den Ausführungen des Herstellers, eine RNA-Oligo Sequenz an das 5'-Ende der gewonnenen RNA ligiert und die so modifizierte RNA über spezifische RNA Oligo Primer, einen *GeneRacer*TM Oligo-dTPrimer und Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco-BRL) revers transkribiert.

Die daran anschließende PCR-Amplifikation wurde mit Gene Racer™ 3'Primer, dem GeneRacer™ 3'Nested Primer (Invitrogen) und den spezifischen Primern (Keck Oligonucleotide Synthesis Facility, Yale University) durchgeführt (Tab. 1).

Unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase (New England Biolabs Inc., Beverly, CA) in einen Hybrid Thermal Cycler (Middlesex, UK) wurden erst Abschnitte, dann die vollständige spezifische cDNA synthetisiert. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 1. Zyklus 94,5°C für 55 sek. 2. – 32. Zyklus 94,5°C für 55 sek., 60°C für 55 sek., 72°C für 1 min. 45 sek., 33. Zyklus 72°C für 7 min.

Tabelle 1

SFGEYW forward	GTCAAGTTTCGGCGAGTACTGGAG
SFGEYW reverse	CTCCAGTACTCGCCGAAACTTGAC
INKPLR forward	CACATTAACAAGCCGCTTCGTCG
INKPLR reverse	CGACGAAGCGGCTTGTTAATGT
MSVV forward	CAATGTCGGTTGTGGAATCG
VLIGLM reverse	GAAGTTTAGTCCAATAAGGACAC
3PRIME reverse	CGACGAGTCGCATCCTTTTCCA
CTNHE reverse	<u>CGGTAGCTAGCCATGATCTGTATTTTGCTCGG</u>
NTNCO forward	GAGACCATGGCGGTTGTGGAATCGAAG

Tab.1 Spezifische Primer. **MSVV** setzt am Beginn des *TgACAT* an. **3PRIME** (revers) beginnt am Ende des Stopcodons. **CTNHE** (revers): fügt am C-terminalen Ende das Hämagglutinin-Epitop ein (unterstrichene Sequenz), mit darauf folgender Schnittstelle für das *Nhe I*-Enzym. **NTNCO** Primer für den Beginn des Gens, es fügt eine Schnittstelle für das *Nco I*-Enzym ein.

Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden erst mit einem Reinigungs-Kit (Qiagen, Hoffmann-La Roche) laut Herstellerprotokoll von den Reagenzien der PCR gesäubert, dann über ein 0,8% Seakem Gel (+ Ethidiumbromid 0,2%) aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Einzelne Banden der PCR-Reaktion wurden ausgeschnitten und

in den Vektor pHXNTPHA kloniert. Transformiert wurden die Plasmide unter Ampicillinselektion in *Epicurian coli* transfecting competent cells (XL1-blue Stamm, Stratagene). Aufreinigung, Verdau und Detektion wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Die so erhaltene DNA wurden in der W.M. Keck Sequencing Facility, Yale University School of Medicine sequenziert.

Das Gen und die cDNA-Sequenz des *TgACAT* wurden in die GenBank™-Datenbank unter den Zugangsnummern AY327327 (Gen) und AY327326 (cDNA-Sequenz) und unter dem Namen *TgDGAT1* abgelegt.

3.2.2.2 DNA Konstrukte und deren Mutation – Für die Konstruktion und die Subklonierung des offenen Leserasters (ORF) wurde ein weiterer Primer für das 5'Ende des ORF synthetisiert (NTNCO), der durch eine erneute PCR-Reaktion eine Punktmutation der Sequenz (*TgACAT* Serin2 zu Alanin) herbeiführte, so daß der Beginn des ORF auch als Restriktionsstelle für das Enzym *Nco I* zugänglich wurde. Ein weiterer Primer (CTNHE) und erneute PCR-Reaktion fügte an den C-Terminus eine Sequenz von 11 Basen an, die eine Restriktionsstelle für das Enzym *Nhe I* darstellte und gleichzeitig das Stopcodon am Ende des ORF eliminierte.

Das ORF wurde in die *Nco I-Nhe I*-Stelle eines NTPase 3 Expressions Cassetten Plasmid (T.T. Stedman, nicht publiziert) kloniert. Dieser Vector beinhaltet den 5'Promoter, eine nicht-translatierte Region (UTR) und eine 3'UTR eines Genes der *T. gondii* NTPase, einem endogenem „dense granule“ Protein. Durch das Klonen des ORF in den Vektor fügte ich der Ausgangs-DNA eine 9 aa lange Sequenz mit anschließendem Stopcodon an der *Nhe I*-Restriktionsstelle an, die für das Hämagglutinin (HA: YPYDVPDYA) Epitop des *Influenza* Virus codiert.

3.2.2.3 Transiente Transfektion von *T. gondii* – Parasiten von RH Stamm wurden wie oben beschrieben aus HFF Zellen gewonnen, von Zelltrümmern gereinigt und die Anzahl/ ml bestimmt und zu einer Konzentration von 5×10^7 / ml verdünnt. Als Medium wurden bei diesen Versuchen steriles Cytomix 1x verwendet (für 2x: 2,4 KCl, 30 mM CaCl₂, 200 mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄ pH 7,6, 0,5 HEPES pH 7,6, 80 mM EGTA pH 7,6, 100 mM MgCl₂, H₂Odest. im Verhältnis 1:0,1:1:1:0,5:1:5,4). Die Plasmide wurden durch Elektroporation (mit BIO-RAD Gene Pulser Electroporator, Richmond, CA) in

die Parasiten transfiziert. Die Zusammensetzung des Versuches war für 400 µl berechnet: Parasiten 5×10^7 / ml, Elektroporationspuffer (1x Cytomix +2 mM ATP + 5 mM GSH (Gluthation)) und Plasmid-DNA 50 µg. Diese Elektroporationsmischung wurde in 0,4 cm Küvetten (BIO-RAD) mit 1,5 kV und 250 nF geschockt, dann für 8 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgeschlossener Elektroporation wurden vorbereitete 24-Kammer-Kulturplatten (HFF in α -MEM8 auf Deckgläsern zur Subkonfluenz gewachsen) mit den transfizierten Parasiten infiziert. Nach einer Infektionszeit von 16 - 24 Stunden (h) konnten die weiterführenden Experimente an den Parasiten vorgenommen werden.

3.2.2.4 Transiente *TgACAT*-Expression in Säugetierzellen – Zur transienten Proteinexpression in Säugetierzellen wurde das Transfektionsreagenz Fu-Gene (Roche) in einem Verhältnis von 1:3,5 (Plasmid DNA: Transfektionsreagenz) verwendet und mit reinem F-12 Medium gemischt. Die zu transfizierenden Zellen wurden zur Subkonfluenz wachsen gelassen und, um den Monolayer nicht zu zerstören, vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Menge der Transfektionsmischung wurde so gewählt, daß sie die Zellen nur bedeckte (Ø 10 cm Kulturplatte 2 ml, 24-Kammer Kulturplatte 100 µl/ Kammer), bei einer Plasmid-DNA-Konzentration von 1-5 µg/ 2 ml. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Kulturplatten mit herkömmlichem F-12 Medium (siehe oben) ergänzt. Daran sich anschließende Experimente erfolgten 18 - 24 h nach Transfektionsbeginn.

3.2.3.1 Vitalität von *T. gondii* – Die Vitalität der Parasiten wurde über spezifische Markierung von *T. gondii* mit radioaktiven Uracil bestimmt (Nakaar et al., 1998; Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977). Dabei wurden mit Parasiten infizierte HFF mit radioaktiv markiertem Uracil (0,5 µCi/ 200 µl) in α -MEM Medium gelöst und bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurde das Medium entfernt, das intakte mit Parasiten infizierte Monolayer 3-malig mit eiskaltem PBS gewaschen und über 15 min. mit 10% TCA präzipitiert. Nach weiterem 2-maligen Waschen mit PBS wurde 200 µl von 0,2 M NaOH hinzugefügt, um die Zellen unter 15-minütiger Rotation bei 37°C zu zerstören. Aliquots dieser Mischung wurden unter dem Szintillationszähler auf die in die

Parasiten-DNA eingebaute Radioaktivität gemessen, während ein anderer Teil auf den Proteingehalt untersucht und beide Ergebnisse gegeneinander abgeglichen wurden.

3.2.3.2 Proteinkonzentrations-Bestimmung – Parasiten: freie *T. gondii* wurden, wie oben beschrieben, gewonnen, gereinigt und ihre Anzahl bestimmt. Die Zellkultur wurde 3-malig mit PBS gewaschen und mechanisch aus dem Monolayer gelöst, die Zellstrukturen durch Passagen durch eine 27-gauge Nadel zerstört. Mit BCA (Bicinchoninic Säure Assay) Protein Assay Kit (Pierce) wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers die Konzentration der Proteine bestimmt. Für die Standardkurve und Standardkonzentration wurde Rinderserum-Albumin verwendet.

3.2.3.3 Analyse von Proteinsequenzen – DNA, Aminosäure Sequenz Analyse und Vergleiche, sowie Alignments wurden mit Hilfe von DNA-Strider, Prosite und GAP Programmen durchgeführt.

3.2.3.4 Analyse des Northern Blots – *T. gondii* RNA wurde mit Trizol Reagenz isoliert, auf einer 1,2% Agarose/ Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Mit Hilfe der willkürlichen-Oligonukleotidprimer-Verlängerungsmethode (Roche, Mannheim, Deutschland) wurde die den kodierenden DNA-Strang des *TgACAT* enthaltene DNA-Sonde mit [³²P]-dCTP markiert. Diese Sonden wurden zur Hybridisierung der Blots verwendet. Die Reaktion in 50% Formamid, 6x SSC, 1x Denhardt's, 5% Dextransulfat, 0,1% SDS, 50 mg/ml Hefen-RNA erfolgte übernacht bei 50°C. Nach einem Waschgang mit 0,1x SSC, das 0,1% SDS enthielt, wurde der Blot durch Autoradiographie entwickelt.

3.2.3.5 Gewinnung von frischem LDL (Zonale Dichtegradient-Ultrazentrifugation)
- von einer nüchternen (eine Fastenzeit von mehr als 12 h) gesunden Person wurden 60 ml Blut abgenommen, die Gerinnung durch Zugabe von 10 ml EDTA gehemmt. Um die festen Blutbestandteile vom Serum zu trennen, wurde diese Mischung für 20 min. bei 2000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Beckman GPR Zentrifuge, GS-6R). Die Dichte des Serums wurde bestimmt (H₂Odest. als Standardabgleichung) und

daraufrin auf 1,25 g/ ml [(1,25-Dichte der Probe)/ (1-[0,31 x 1,25])] mit KBr abgeglichen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Durch Zentrifugieren für 24 h bei 40 K rpm (Beckman L8-70M Ultrazentrifuge) trennten sich die Lipoproteine vom Serum. Nach vorsichtigem Aspirieren der Lipoprotein Bande wurde erneut die Dichte der gewonnenen Probe bestimmt und mit KBr auf 1,3 g/ ml ergänzt, in mit 0,09% NaCl versehenen Reagenzröhrchen gefüllt und weitere 4 h bei 49 K rpm zentrifugiert. Bei diesem Schritt teilten sich die verschiedenen Lipoproteine in Abhängigkeit ihrer Dichte (im Sinne eines zonalen Dichtegradienten [VLDL und Chylomikronen, LDL, HDL, am Grund des Reagenzröhrchen Albumin und Proteine mit geringem Molekulargewicht]) und konnten einzeln aspiriert werden. Um das zugesetzte KBr aus dem LDL zu entfernen, wurde das LDL in einer Dialysemembran (Porengröße 6- 8000 molecular weight cores) in 4°C kaltem PBS über 72 h dialysiert, wobei das PBS 6x ausgewechselt wurde. Mit Abschluß des Dialysevorgangs wurde die Konzentration der Lipoproteine bestimmt (als Standardprotein Rinderserum Albumin). Die LDL wurden sterilisiert, indem sie durch 0,2 Micron-Membranfilter passiert und dann in sterilem Gerät bei 4°C aufbewahrt wurden. Die bei den Versuchen verwendete Konzentration des LDL lag zwischen 0,7-1,0 mg LDL/ ml.

3.2.3.6 Radioaktiv markiertes frisches LDL – Um LDL radioaktiv zu markieren wurde frisch gewonnenes Serum mit dem radioaktiven Reagenz [1,2-³H]Cholesterin, 1 ml/ 30 ml, in Berührung gebracht und unter vertikaler Rotation bei 37°C über 24 h inkubiert. Bei diesem Vorgang wurde das Cholesterin in den Kern des LDL integriert. Bei Abschluß des Reinigungsvorgangs von LDL wurde neben der Konzentration auch die spezifische Aktivität des LDL unter Szintillationszählung bestimmt (Packard: Tri Carb 2500 TR Liquid Scintillation Analyzer).

3.2.3.7 ACAT-Aktivitätsassay – HFF, CHO Zellen oder HFF mit *T. gondii* infiziert wurden im gewünschten Medium wachsen gelassen (LPDS, LDL, Standard). Nach 3-maligem Waschen der Monolayer mit PBS wurde dem gewünschten Medium 300 µl 10 mM radioaktives Oleat (1-5 µCi) oder radioaktiv markiertes frisches LDL (1-5 µCi) zugesetzt und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion nach der Pulsexposition

zu beenden, wurden die Kulturplatten auf Eis transferiert und das radioaktive Medium ausgewaschen.

Je nach Fragestellung schlossen sich weitere Experimente an (Lipidextraktion, Lipidanalyse, Proteinbestimmung, Radioaktivitätsbestimmung).

3.2.3.8 Lipidextraktion aus Zellverbänden – CHO oder HFF-Zellen - mit *T. gondii* infiziert oder als reine Zellkulturen – wurden 3-malig mit PBS (4°C) gewaschen und mechanisch bei 4°C aus den Petrischalen gelöst. Durch Zentrifugation bei 200 rpm wurden Pellets gebildet und diese in jeweils 500 µl H₂Odest. und 2,5 ml Chloroform/ Methanol (2:1) aufgelöst. Die so gewonnenen Proben wurden für 2 h bei Raumtemperatur horizontal gevortext, wiederum zentrifugiert (10 min., 2500 rpm), so daß sich zwei Phasen (obere Phase: Überstand/ untere Phase: Lipide) bildeten. Die untere Phase mit den Lipiden wurde aufgenommen und unter Nitrogengas verdampft. Die so extrahierten Lipide wurden in 200 µl Chloroform gelöst und über TLC getrennt.

3.2.3.9 Lipidanalyse – die aus den Zellen extrahierten Lipide wurden über TLC von einander getrennt. Für die Detektion von Cholesterinester und Cholesterin wurde Petrolether/ Diethylether/ Essigsäure in einem Verhältnis von 80: 20: 1 als Laufmittel verwendet, für Cholesterinester und Fettsäuren Hexan/ Ether/ Essigsäure (80: 20: 1). Als Kontrolllösung wurden jeweils 20 µl einer Standardlösung von 10 mg gewünschtes Lipid/ ml Chloroform benutzt. Die Versuchsproben wurden jeweils mit einem inneren Standard (15 µl) von oben genannter Konzentration versehen. Nach einer Stunde Laufzeit wurden die getrennten Lipide unter Abschirmung von Luftbewegungen in einer abgeschlossenen Glasküvette mit Hilfe von Jodgas angefärbt und die Umrisse der einzelnen Lipidbanden markiert.

3.2.3.10 Messung der Cholesterinesterbiosynthese und Bestimmung der Inkorporation von radioaktivem Cholesterin oder Fettsäuren in Cholesterinester – die aufgetrennten und markierten Lipidbanden der TLC wurden einzeln vorsichtig abgekratzt und in Szintillationspuffer aufgefangen und der Szintillationszählung zugeführt. Die Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmung wurden in Zusammenhang

mit der Ausgangsproteinkonzentration/ Probe und der Radioaktivität/ Probe bei Beginn und bei Ende der Lipidextraktion gesetzt.

3.2.3.11 Fixieren extrazellulärer Parasiten – die gereinigten, auf ihre Konzentration hin bestimmten (siehe oben) *T. gondii* wurden zu einer Konzentration von 1×10^4 Parasiten/ ml in PBS verdünnt und in 50 μ l Tropfen auf Objektträger aufgetragen und sich im Inkubator (37°C) für 30 min. setzen (mit L-Lysin, für bessere Adhäsion beschichtete Objektträger oder normal gebräuchliche Objektträger), aber nicht trocknen gelassen. Zur Fixierung wurde mit der Pipette 25 μ l PFA 3% auf die Parasiten-Tropfen gegeben und dann mit derselben Technik, wie auch für die HFF Monolayer beschrieben (siehe unter 3.2.3.13), mit den Wasch- und Färbvorgängen fortgefahren.

3.2.3.12 Lipidstruktur erhaltende Fixierung – die sonst mit reinem Methanol oder Azeton durchgeführte Fixierung von Zellen wurde durch Paraformaldehyd (3% PFA) ersetzt und so die Struktur der Membranen und Lipidformationen der Zellen/Parasiten erhalten. Nach 3- maligem Waschen mit 4°C PBS wurden die Zellen mit 3% PFA überdeckt und für 15 min. fixiert, daraufhin wieder mit PBS 3- malig gewaschen und dem nächsten Schritt zugeführt.

3.2.3.13 Färbung von Neutrallipiden – Für Lipidfärbungen verwendete ich entweder Oil Red O (Basiskonzentration 0,5% in Isopropanol, zur Verwendung mit H₂Odest. 1: 2 verdünnt) oder Nile Red (Basiskonzentration 10% in Azeton, auf 0,01% mit H₂Odest. verdünnt). Detektiert wurden beide Lösungen unter Rhodaminlicht des Lichtmikroskopes, Nile Red reagiert zusätzlich auch im FITC-Kanal mit breiter Fluoreszenz.

HFF Zellen wurden in Monolayers auf 12 mm Ø Deckgläsern in 24-Kammer Kulturplatten wachsen gelassen. Nach Fixierung (siehe unter 3.2.3.12) wurde jeweils 250 μ l der Lipidfärbung/ Deckglas und Kammer auf die Zellen gegeben und für 45 min. inkubiert. Die daraufhin 3- malig mit PBS gewaschenen Deckgläser (ein über jeweils 5 min. dauernder Vorgang) wurden mit der Zelllage nach unten in 5 μ l Moviol auf Objektträgern platziert und für mindestens 4 h trocknen gelassen. Alle Schritte fanden bei Raumtemperatur statt, dabei wurde mit Beginn der Lipidfärbung unter

Ausschluß von künstlichem Licht oder Tageslicht gearbeitet. Da diese Lipidfärbungen mit der Zeit auch ohne direkte Lichteinwirkung verblassen, wurde die Lichtmikroskopie innerhalb von 2 Tagen nach Herstellung durchgeführt.

3.2.3.14 Immunfluoreszenz Analyse – HHF Zellen wurden in Monolayers auf 12 mm Ø Deckgläsern wachsen gelassen (24- Kammer-Kulturplatte) und fixiert, wie beschrieben (siehe 3.2.3.12). Nach einem Waschvorgang mit PBS wurden die Zellen mit TritonX 100 0,3% für 4 min. permeabilisiert (extrazelluläre *T. gondii* für 4 min.; mit *T. gondii* infizierte Zellen: 6 min.) und wiederum 2- malig mit PBS gewaschen. Um unspezifische Reaktionen innerhalb der Zellen (oder *T. gondii*) mit den Antikörpern zu verhindern, wurden die Deckgläser mit BSA 3% in PBS über 15 min. geblockt und wiederum gewaschen. Der erste Antikörper (Maus-Anti-HA, Konzentration 1: 200 in 3% BSA/ PBS) inkubierte für 45- 60 min., dem folgte ein 3- maliger über 20 min. dauernder Waschvorgang, der sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Maus-FITC, Konzentration 1:250 in 3% BSA/ PBS). Die Inkubationszeit wurde zwischen 30- 60 min. gewählt. Nach weiteren Waschvorgängen (PBS 3x, über 30 min.), wurden die Deckgläser wie oben beschrieben auf Objektträger aufgebracht und unter dem Mikroskop examiniert.

3.2.4 Licht- und Elektronenmikroskopie – Licht- und Epifluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Microphot FXA Mikroskop (Nikon INC., Melville, NY) an einzeln auf sterilen 12 mm durchmessenden Deckgläsern gewachsenen Zelllagen (mit oder ohne *T. gondii* infiziert) vorgenommen, dabei wurden die Bilder direkt von der aufnehmenden Photometrics SenSys CCD Kamera an Image-Pro Plus Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) transferiert und in Adobe Photoshop Software (Adobe Systems Inc.) bearbeitet.

Für die Dünnschicht Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden Zellen (mit *T. gondii* infiziert) in ihrer Petrischale mit 2,5% Glutaraldehyd (EM Science) in 0,1 M Natrium-Cacodylat Puffer (pH 7,4) fixiert. Nach 3- maligem Waschen mit 0,1 M Cacodylat Puffer fand die Nachfixierung mit 1% Osmiumtetroxid (EMS) im selben Puffer statt. Nach weiterem 3- maligen Waschen, diesmal mit H₂Odest., wurden die Kulturen 2% Uranylazetat (EM Science) gefärbt. All diese Schritte fanden in

Raumtemperatur statt und dauerten je 1 h/ Vorgang. Erneutes Waschen mit Wasser und Dehydratation mit Ethanol schlossen sich daran an. Die zu bearbeitenden Proben wurden in Embed-812 EpoxyResin (EMS) eingelassen und mit einem Reichert Ultracut Ultramicrotom in ultradünne (50-60 nm) Schichten geschnitten und an formvar- und karbon beschichtete Nickelgitter ausgebreitet. Färbungen mit 2% Uranylazetat und Bleizitrat folgten. Mit 80 kV unter einem Philips 410 Elektronenmikroskop (Eindhoven, Niederlande) wurden die EM Proben untersucht (Fölsch et al., 2001). Die entstandenen Negative wurden in den Fotolabors der Yale University Electron Microscope Facility entwickelt, auf Kodak Photopapier abgezogen und in Adobe Photoshop eingescannt (Hewlett Packard, ScanJet IICx).

Für die Immunelektronenmikroskopie wurden die Zellen 48 h bei 4°C mit 8% Paraformaldehyd (EMS) in 0,25 M HEPES (pH 7,4) fixiert. Wie beschrieben, wurden sie infiltriert, gefroren, geschnitten und markiert, mit dem Unterschied, daß Maus-Anti-HA Antikörper benutzt wurden (1:50 in PBS/ 1% Fischhautgelatine), mit einem sich direkt daran anschließenden Markierungsschritt mit 5 nm Protein-A-Goldpartikeln (Department of Cell Biology Medical School, Utrecht University, Niederlande).

3.2.5 Statistische Auswertung – Um die Mittelwerte vergleichen zu können, wurde P bestimmt, indem die Varianz in Beziehung zur Kontrolle/ Standard gesetzt wurde (ANOVA 2).

4. Ergebnisse

4.1 *T. gondii* synthetisiert Cholesterinester aus verschiedenen Substraten

Daß *T. gondii* unterschiedliche Lipide und Lipidkomponenten verstoffwechselt, zeigten erste Lipidanalysen in Form von Dünnschichtchromatographien. Neben den im Zytoplasma von *T. gondii* zu erwartenden Triglyzeriden und Cholesterin fanden sich auch Cholesterinester, die wie in Säugetierzellen im Zytoplasma als Neutrallipide vorliegen. Sie stellen sich unter dem Lichtmikroskop als kugelige Gebilde, unter dem Elektronenmikroskop als elektronen-dichte Organellen dar, die teilweise von einer ein- oder zweilagigen Membran umgeben sind (Londos et al., 1999; Pol et al., 2001).

Um sich qualitativ und quantitativ ein Bild von der Zusammensetzung dieser Cholesterinester machen zu können, wurden intrazelluläre Parasiten mit verschiedenen radioaktiv markierten Lipidkomponenten inkubiert, nach festgelegten Zeitintervallen (0 h, 12 h, 24 h, 48 h) die Reaktion gestoppt und mit der Cholesterinester-Analyse begonnen.

Die Ergebnisse des Cholesterinester-Inkorporationsversuchs sind in Tab. 2 aufgeführt. Nicht ausschließlich Cholesterin und Fettsäuren (in diesem Fall Oleat; C18:1) sind Bestandteil der Cholesterinester, die in *T. gondii* gefunden werden, eine andere Zusammensetzung der Cholesterinester besteht in Cholesterin und dem Phospholipid Phosphatidylcholin. Neben der Qualität der gebildeten Cholesterinester wurde auch sichtbar, daß über längere Inkubationszeitintervalle mit den radioaktiven Substraten die Menge an Cholesterinester zunimmt.

4.2 Variierende Lipoproteinkonzentrationen im Medium beeinflussen die Cholesterinestersynthese von *T. gondii*

In Säugetierzellen ist zu beobachten, daß höhere Lipoproteinkonzentrationen eine erhöhte Anzahl von Lipidkörpern im Zytoplasma zur Folge haben. Die Regulation der

Cholesterinhomöostase spielt sich auf vielen, teilweise noch nicht vollständig geklärten zellulären Ebenen ab. Die mit der Cholesterinhomöostase verbundene Bildung von Cholesterinestern hängt von der Aktivität der ACAT ab, die allosterisch von freiem Cholesterin reguliert wird (Cadigan et al., 1988; Doolittle und Chang, 1982a; Doolittle und Chang, 1982b).

Reaktionen auf Veränderungen der Lipoproteinkonzentrationen ließen sich auch lichtmikroskopisch in *T. gondii* beobachten. Normalerweise finden sich ein bis zwei Lipidkörper im Zytoplasma der tachyzoiten Form von *T. gondii*. Werden dem Medium zu den üblichen 10% FBS zusätzliche Lipoproteine hinzugefügt (1 mg LDL/ 10 ml

Tabelle 2

	verwendete Pulssubstrate	aufgenommene Lipide (cpm/ µg Protein)	synthetisierte CE (cpm/ µg Protein)	
1 h	[³ H]C-LDL	523 ± 22	3 140 ± 11	(n = 4)
3 h	[³ H]C-LDL	850 ± 44	4 910 ± 165	(n = 4)
24 h	[³ H]C-LDL	1 310 ± 62	10 890 ± 180	(n = 5)
½ h	[³ H]Oleat-BSA	390 ± 32	2 099 ± 123	(n = 3)
3 h	[¹⁴ C]PC-BSA	877 ± 54	3 388 ± 230	(n = 3)
3 h	[¹⁴ C]PC-LDL	243 ± 30	989 ± 55	(n = 3)

Tab.2 zeigt die gemessenen radioaktiven Zerfallsmomente pro Minute, die von [³H]-Cholesterinestern und den jeweiligen in *T. gondii* aufgenommenen Substraten ([³H]-Cholesterin, [³H]-Oleat, [¹⁴C]-Phosphatidylcholin). Die *T. gondii* Kulturen inkubierten mit den Substraten zwischen ½ h bis 24 h bei 37°C. Die Versuche wurden zwischen drei- oder fünfmal wiederholt. (C = Cholesterin; PC = Phosphatidylcholin, CE = Cholesterinester)

Medium), nimmt die Anzahl der Lipidkörper auf durchschnittlich 4/ Tachyzoit (n = 500) zu (Abb. 5A). *T. gondii* benötigt beständig diese erhöhten Konzentrationen an LDL um die Lipidkörperproduktion aufrecht zu erhalten. Andererseits nimmt die Zahl der Lipidkörper wieder ab, wenn die Kulturen mit normalem Lipoproteingehalt inkubiert werden. Es handelt sich bei der Bildung der Lipidkörper um eine direkte Reaktion auf verschiedene Lipoproteinkonzentrationen, die vollständig reversibel ist. Bei Entzug des LDL aus dem Medium verkleinerten sich die Lipidkörper erst visuell, nach längerer Inkubationszeit waren sie in den Tachyzoiten nicht mehr nachweisbar (Abb. 5B).

Um die visuellen Veränderungen der Lipidkörper und deren Anzahl in Abhängigkeit zur Lipoproteinkonzentration quantitativ erfassen zu können, wurden weitere Tachyzoitenkulturen angelegt und unter variierenden Lipoproteinkonzentrationen wachsen gelassen. Als Abwandlung wurde radioaktiv markiertes Cholesterin mit frischem LDL assoziiert, oder radioaktives Oleat-BSA dem Medium zugesetzt. Die qualitative und quantitative Bestimmung der Cholesterinesterbildung erfolgte über Cholesterinester-Inkorporations-Assays und Szintillationszählung nach Lipidauftrennung des neu gebildeten jetzt radioaktiv markierten Cholesterinesteranteils. Die Ergebnisse sind in Abb. 6A und 6B dargestellt. Um einem falsch positiven Ergebnis vorzubeugen, das möglicherweise durch ein gesteigertes Wachstum der Tachyzoiten bei gleichem Cholesterinestergehalt entstehen könnte, wurde eine genau definierte Menge an Zelllysat vor der Lipidanalyse für eine vergleichende und quantitative Proteinbestimmung nach BCA vorbereitet und mit den endgültigen Radioaktivitätsmessungen abgestimmt.

In Säugetierzellen wurde beschrieben, daß sich die Cholesterinhomöostase über transkriptionelle, translationelle und posttranslationelle Mechanismen reguliert (Brown und Goldstein, 1999; Goldstein und Brown, 1990; Lange et al., 1996).

Einer dieser Mechanismen ist die erhöhte Expression des veresternden Enzyms ACAT. Um Anhaltspunkte des Expresionsniveau des Parasiten-Enzyms zu erhalten, wurden aus einer genau definierten Menge an Zelllysat Northern Blots vorbereitet. Als vergleichender Parameter wurde das Zytoskelettprotein α -Tubulin ausgesucht. Seine Expressionsniveau wird nicht vom Zellmetabolismus beeinflusst. Wird angenommen, daß ein anderes Protein abhängig vom Zellmetabolismus in seinem Expressionsniveau

variiert, können vergleichend der RNA-Gehalt des α -Tubulins zu dem des untersuchten Proteins bestimmt werden. Die Northern Blot Ausschnitte in Abb. 6A und 6B von α -Tubulin und *Tg*ACAT lassen annehmen, daß mit variierenden extrazellulären Lipoproteinkonzentrationen die Expression des ACAT Enzyms durch erhöhte oder verringerte *Tg*ACAT-RNA beeinflusst wird (Abb. 6A und 6B, kleine Ausschnitte).

4.3 cDNA des *Tg*ACAT

4.3.1 cDNA-Identifizierung eines ACAT-verwandten Enzyms von *T. gondii*

Durch Homologiesuche in der *T. gondii* EST Datenbank (Genbank Zugangsnummer N82383) mit Hilfe einer eine O-Acyltransferase kodierenden Sequenz, konnten ich einen EST Klon identifizieren, der einige Gemeinsamkeiten mit dem C-Terminus der menschlichen ACAT-1 aufweist. Die vollständige cDNA, die dem EST entspricht, ist 1620 bp lang und enthält einen kodierenden Strang (ORF) für ein 540-aa langes Protein (Abb. 7). Der Sequenzvergleich von *Tg*ACAT zu *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae* und menschlicher ACAT-1 zeigen zwei Auffälligkeiten, die all diesen Sequenzen zu eigen sind: ein invariables Serin (Ser244 in *Tg*ACAT), das als Teil einer potentiellen Cholesterinbindungsstelle mit dem Motiv HSF oder YSF gesehen wird (*Tg*ACAT: FSF 243 -245), und das erhaltene Motiv (FGDREFYxDWWN in *Tg*ACAT 396 - 407), das die potentielle Fettsäurenbindungsstelle beinhaltet (Guo et al., 2001).

Die Sequenz hat einige hydrophobe Domänen, die von einem Transmembranregionen-vorhersage- Programm (http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html) in neun mögliche die membranspannende Protein-Abschnitte eingeteilt werden.

Ein invariables Histidin (His466 *Tg*ACAT), das von einer langen hydrophoben Region umgeben wird, findet sich in der Sequenz. Es gilt als charakteristisches Merkmal für die Überfamilie der Membran gebundenen O-Acyltransferasen (Hofmann, 2000).

In der phylogenetischen Analyse (Abb. 8) ist das Protein näher mit der Diacylglycerin: Acyl-Transferase (DGAT) verwandt, als mit der ACAT. Werden beide Enzymfamilien (ACAT und DGAT) einer Species miteinander verglichen (Tab. 3), fällt auf, daß vor

allein am C-Terminus lange Abschnitte bestehen, die hohe Homologien untereinander aufweisen.

Abbildung 8

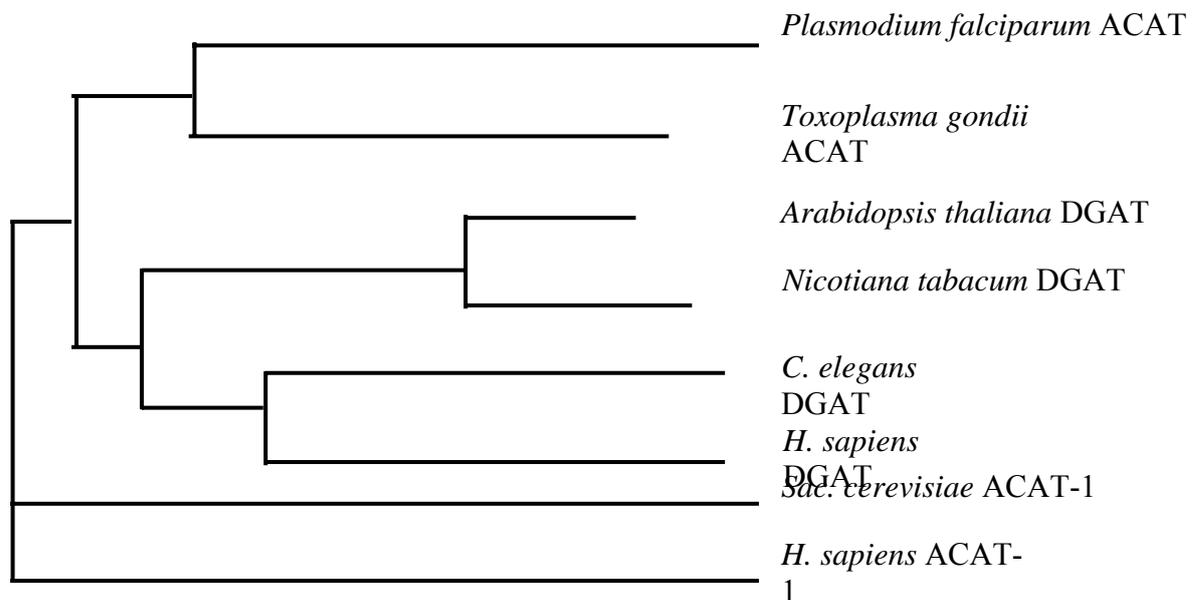


Abb.8 zeigt das phylogenetische Dendrogramm der cDNA von *T. gondii* ACAT. Neben dem aus derselben Familie der Apikokomplexa stammende *P. falciparum* ACAT, finden sich eher DGAT cDNA von Pflanzen und niedrigen Organismen. Auch die menschliche DGAT Sequenz ist näher mit der beschriebenen cDNA verwandt als die der menschlichen ACAT-1.

Tabelle 3

	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
<i>H. sapiens</i> DGAT	26,9	41,4
<i>H. sapiens</i> ACAT-1	18,5	31,6
<i>P. falciparum</i> ACAT	26,9	39,9
<i>Sac. Cerevisiae</i> ACAT-1	17,9	31,9
<i>C. elegans</i> DGAT	24,3	27,9
<i>Nicotiana tabacum</i> DGAT	26,7	41,0
<i>Arabidopsis thaliana</i> DGAT	29,6	44,9

Tab.3 zeigt die Identität und Ähnlichkeit der ACAT-1 und DGAT cDNA verschiedener Species gegenüber *T. gondii* in Prozent.

4.3.2 Expression und Lokalisation des TgACAT

Die 540-aa Sequenz des TgACAT läßt auf ein theoretisches Molekulargewicht von 63,4 kDa schließen. In der Migration des translatierten Produktes unter Elektrophorese wurde ein nur 44 kDa großes Peptid gefunden. Dies kann daran liegen, daß das Peptid in seiner vollen Länge weiter als erwartet wanderte, oder daß nur ein N-Terminusfragment synthetisiert wurde. Um letztere Möglichkeit auszuschließen, wurde an den C-Terminus des TgACAT ein 9-aa Hämaggglutinin (HA)-Epitop des *Influenza* Virus fusioniert. Eine das TgACAT-HA stabil exprimierende Mutante des wildtypischen *T. gondii* wurde generiert. Nach erneuter Elektrophorese mit dem mutierten Gen wurde dasselbe Molekulargewicht von 44 kDa bestimmt, Gegenproben mit Antikörperbeschickung gegen das HA-Epitop zeigten, daß das Peptid in voller Länge exprimiert worden war (Daten nicht gezeigt).

Zur Lokalisation des Proteins wurde die mutierte Form des TgACAT-HA im IFA mit Antikörper gegen das HA-Epitop inkubiert und unter Lichtmikroskopie betrachtet. Hauptsächlich um den Nukleus zieht sich ein Fluoreszenznetzwerk, das sich aber auch weiter im Zytoplasma verteilt (Abb. 9A). Da für *T. gondii* bisher kein ER-Marker

existiert, konnte keine Co-Lokalisation von *Tg*ACAT-HA und einem ER-lokalisierenden Protein dokumentiert werden. Das in Säugetierzellen verwendete α -Calnexin führte zu keinem befriedigend detektierbarem Signal in *T. gondii*.

In Säugetierzellen (AC29 Zellen und MEF3 $-/-$ ACAT), die transient mit dem *Tg*ACAT-HA transfiziert wurden, co-lokalisiert der Parasiten- mit dem Säuger-ER-Marker α -Calnexin (Abb. 9B).

Die stabil exprimierenden *Tg*ACAT-HA mutierten Parasiten wurden zur näheren Beschreibung des sich im Lichtmikroskop darstellenden Fluoreszenznetzwerks zur Immunelektronenmikroskopie vorbereitet. Das Kompartiment stellt sich dort intensiv markiert dar, und wurde eindeutig als ER identifiziert. Kortikales und perinukleäres ER sind mit an Goldkugeln assoziierten Antikörpern bestückt, während sich keine Markierung an oder in anderen Parasiten- oder Säugerstrukturen finden läßt (Abb. 9C). Mit der eindeutigen Lokalisation des *Tg*ACAT Enzyms im ER ist mit diesem Enzym der erste endogene *T. gondii* ER-Marker gefunden und beschrieben worden.

4.3.3 Die Funktion des *Tg*ACAT

AC29, eine Zelllinie der CHO ohne Fähigkeit Cholesterinester zu bilden, wurden transient mit dem *Tg*ACAT-HA transfiziert und unter standardisierten Bedingungen Lipidseparation, Lipidanalyse und Radioaktivitätsmessung durchgeführt. Zur Bestimmung der Transfektionsrate des jeweiligen Versuchansatzes wurden in die Zellkulturen Deckgläser eingebracht, auf denen sich ein Teil der verwendeten Zellen angelagerten und festsetzten. Diese die Zellkultur repräsentierenden, auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen, wurden bei Versuchsbeginn separat in IFA aufbereitet. Entsprechend der damit bestimmten Transfektionsrate wurden die Werte des ACAT-Assays abgestimmt (Abb. 10).

Durch Transfektion mit *Tg*ACAT erhalten AC29 ihre Fähigkeit Cholesterinester zu bilden, bzw. radioaktiv markiertes Cholesterin mit freien Fettsäuren zu verestern ($3\ 900 \pm 420$ cpm für die transfizierte Zellreihe, AC29 180 cpm, CHO-Kontrollzellen $41\ 500 \pm 600$ cpm), allerdings sind sie quantitativ ungefähr 20-fach weniger potent in ihrer Funktion als die Kontroll-CHO.

4.4 Inhibitoren für Säuger-ACAT-1

4.4.1 Effekt von Inhibitoren auf die Aktivität der *T. gondii* ACAT

In Säugetieren wurde eine spezifische Wirksamkeit von ACAT-Inhibitoren beschrieben, die in der Reduktion der Cholesterinester *de novo* Synthese resultiert. Zwei dieser ACAT-Inhibitoren sollten an *T. gondii* getestet werden; die Wahl fiel auf die Generika DuP-128 und CI-976 (Strukturformeln der beiden ACAT1-Inhibitoren siehe Abb. 4A und 4B) (Bocan et al., 1991; Harte et al., 1995; Junquero et al., 2001; Rodriguez et al., 1999). Bisher ist nicht bekannt, wie der inhibierende Mechanismus dieser Substanzen wirkt. Es wird aber angenommen, daß es sich um eine reversible kompetitive Hemmung handelt, da sich die Enzymaktivität innerhalb von 24 h nach Auswaschen der Substanzen wieder vollständig einstellt. An Mikrosomen konnte nachgewiesen werden, daß sie spezifisch auf die Aktivität des ACAT1-Enzyms wirken; DuP-128 mit einer fast 100- fach stärkeren Potenz im Vergleich zu CI-976 (IC₅₀: 690 nM gegenüber 59 nM (= 2 µg)) (Field et al., 1991; Huff et al., 1994), dabei verändern sie nicht die Cholesterinaufnahme in die Zelle, oder den Cholesterinanteil in der Zelle. Anhand von ³H-Thymidin-Aufnahme Assays wurde in Vorversuchen der nicht-toxische Wirkungsbereich für die Wirtszellen bestimmt, in dem sie 95- 100% vital, aber innerhalb der inhibitorischen Konzentration von 90% (IC₅₀) der Cholesterinestersynthese sind.

Intrazelluläre Parasiten wurden mit 2,5- 10 µg/ ml Substanz und radioaktiv markierten LDL über 24 h inkubiert, danach die Menge der neu gebildeten Cholesterinester bestimmt.

Abb. 11: Bei einer Konzentration von 2,5 µg/ ml CI-976 zeigt sich eine Abnahme der Cholesterinesterproduktion um 8% nach 24 h, nach 48 h um 26%, bei 5 µg/ ml jeweils 30% und 52%. Bei DuP-128 hingegen erhöht sie sich bei einer Konzentration von 2,5 µg/ ml um 12% (24 h), und (48 h) fiel dann auf den Kontrollkulturen vergleichbare Werte. Bei 5 µg/ ml erniedrigte sich die Cholesterininkorporation in die Ester um 27% und 49%. Im Vergleich dazu verringerte sich die Cholesterinesterproduktion der Wirtszellen (HFF) innerhalb von 24 h mit 2,5 µg/ ml um 80%, mit 5 µg/ ml um 90 bzw. 95%.

4.4.2 Wirkung der ACAT- Inhibitoren auf *T. gondii*

Während der ACAT-Inhibitorversuche war zu beobachten, daß der Gesamtproteingehalt der Parasiten nach Substanzenkontakt immer geringer ausfiel als derjenige der Kontrollkulturen, trotz daß jede Kultur zum Zeitpunkt 0 mit der gleichen Anzahl an Parasiten infiziert worden war.

Durch Zählen der in jeweils 500 Vakuolen enthaltenen Parasiten von Kontrollkultur, und den Kulturen, die für 48 h mit den Inhibitoren (DuP-128 2,5 µg/ ml, CI-976 5 µg/ ml) inkubiert worden waren, bestätigte sich die Annahme, daß insgesamt weniger Parasiten pro Vakuole zu finden waren. Der Teilungszyklus eines tachyzoiten *T. gondii* vom RH-Wildtyp benötigt im Mittel 8 h (Roos et al., 1994) um eine Verdopplung durch Endodyogenie hinter sich zu bringen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h erwarten wir in einer Vakuole durchschnittlich acht Parasiten (drei Teilungszyklen sollten durchlaufen sein). Unter beiden Inhibitoren verringerte sich das Wachstum um 70,4% (DuP-128) und 73,1% (CI-976) im Vergleich zu den Kontrollparasiten (Abb. 12A).

Anhand von [³H]-Uracil-Aufnahmeassays wurde die Vitalität und damit die Replikationspotenz von *T. gondii* in verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen in einem Konzentrationsintervall von 0,2 bis 10 µg/ ml bestimmt. Wie nach den zuvor beobachteten Wachstums- und Replikationsveränderungen von *T. gondii* zu erwarten war, fiel die Vitalität mit zunehmender Inhibitor-Konzentration. Es verändern sich dabei die Werte in Abhängigkeit der Lipoproteinkonzentrationen im Medium. Für *T. gondii* in LPDS-Medium besteht eine toxische Konzentration (TC₅₀) bei 2,31 µg/ ml (DuP-128) und 1,73 µg/ ml (CI-976), unter Standardbedingungen (20 µg/ ml LDL) eine TC₅₀ von 1,92 µg/ ml (DuP-128) und 3,27 µg/ ml (CI-976). Ein Überschuß an LDL scheint die Inaktivierung der Parasiten unter ACAT-Inhibitoren zu verlangsamen (TC₅₀ bei 7,31 µg/ ml (DuP-128) und 8,46 µg/ ml (CI-976)) (Abb. 12B).

Unter ACAT-Inhibitor-Anwendung findet sich in den Wirtszellen erwartungsgemäß ein verändertes ER. Das tubuläre Lumen des Organells ist plump vergrößert und weist geblähte Aussackungen auf (Abb. 13A und 13B), andere Organellveränderungen sind nicht zu beobachten und werden auch in der Literatur nicht beschrieben (Bocan et al., 1991; Harte et al., 1995; Junquero et al., 2001; Rodriguez et al., 1999). Der Inhibition der menschlichen ACAT zufolge wird Cholesterin nicht mehr mit freien Fettsäuren

verestert; dementsprechend werden keine Cholesterinester mehr gebildet. Das sonst abspassende Cholesterin (Murphy und Vance, 1999) verbleibt im ER-Lumen, und mit zunehmender Konzentration führt es zur veränderten Form des ER.

In *T. gondii* finden sich ein normales ER und Lipidkörper (Abb. 13A und 13B). Die Mitochondrien sind extrem vergrößert. Neben Membrangirlanden, die sich durchs Zytoplasma des Parasiten ziehen, sind Organellen zu sehen, die apoptotischen Körpern ähneln. Auffällig ist auch, daß der parasitäre Vakuoleninnenraum um *T. gondii* Trümmer enthält und daß die Integrität der parasitären Membran nicht mehr erhalten ist.

Den elektronenmikroskopischen Bildern zufolge tritt eine Abtötung *T. gondii* unter ACAT-Inhibitor Anwendung durch Lyse der Zell- und Organellmembranen ein (Abb. 13A und 13B, Kontrollparasiten 13C).

5. Diskussion

In Säugetierzellen greifen die Cholesterinester- und Triacylglycerinbiosynthese ineinander. ACAT- und DGAT-Enzyme katalysieren beide die Veresterung von Fettsäuren-Acyl-CoA-Ester entweder mit Cholesterin oder mit Diacylglycerin. Diese Acyltransferasen werden durch unterschiedliche, aber verwandte Gengruppen kodiert, die untereinander große Homologien in verschiedenen Domänen besitzen, besonders im C-terminalen Anteil (Bouvier-Nave et al., 2000). Schon früher wurden Lipidkörper in *T. gondii* beschrieben (Charron und Sibley, 2002; Coppens et al., 2000; Sonda et al., 2001), die auf die Existenz eines Enzyms der Cholesterin- oder Triacylglycerinsynthese hinweisen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, indem sie molekulargenetische, biochemische und zellbiologische Methoden kombiniert, daß *T. gondii* ein ACAT1-ähnliches Enzym exprimiert. In Säugetierzellen mit unzulänglicher Cholesterinestersynthese und ohne nachweislichen Cholesterinester transfiziert, findet sich nach den funktionellen Experimenten eine ACAT-Aktivität, die sich durch deutliche Cholesterinestersynthese manifestiert.

Zum C-Terminus des beschriebenen Gens hin findet sich eine über ACAT und DGAT konservierte potentielle Fettsäurebindungsstelle, wie auch ein in ACAT konserviertes, invariables Serin, das zusammen mit zwei anderen Aminosäuren als potentielle Cholesterinbindungsstelle gesehen wird. Dort zeigt sich eine Varianz der bekannten ACAT-1-Enzyme höherer Eukaryoten. Die Cholesterinbindungsstelle setzt sich nicht wie in den anderen ACAT aus HSF oder YSF zusammen, sondern aus FSF (*Tg*ACAT 243-245). Auch sind beide Bindungsstellen in Säugetieren auf unterschiedlichen Seiten der ER-Membran zu suchen, wobei die Fettsäurebindungsstelle im ER-Lumen liegt (Guo et al., 2001; Joyce et al., 2000; Lin et al., 1999). Je nach favorisierten neun oder zehn Transmembrandomänen des *Tg*ACAT, liegen beide Bindungsstellen auf der zytosolischen Seite des ER (9 TMD), oder auf verschiedenen Seiten, aber mit der Cholesterinbindungsstelle im ER-Lumen (10 TMD). Ob und welchen Einfluß diese

abgeänderte Konfiguration auf die Funktion des TgACAT hat, ist mit den hier dargestellten Versuchen nicht zu erfassen.

Eine andere Serie von Versuchen hat gezeigt, daß das hier beschriebene Gen auch die Funktion eines DGAT1 übernimmt und fähig ist, TAG zu synthetisieren (Quittnat et al., 2004).

Der apikalkomplexe Eukaryot *T. gondii* hat sich vor ungefähr einer Milliarde Jahren von anderen niedrigeren Eukaryoten abgespalten. Da die größte Übereinstimmung der TgACAT mit der pflanzlichen DGAT (z.B. *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*) beobachtet ist, könnte angenommen werden, daß dieses Enzym von der Familie der Algen abstammt. Diese Annahme wird von einer vor kurzem gemachten Entdeckung unterstützt: ein vorzeitliches, nicht-photosynthetisches Plastid, der Apicoplast, wurde durch sekundäre Endosymbiose erworben. Er ist in allen apikalkomplexen Parasiten zu finden und wird von einer Vielzahl an Membranen umgeben. Als Ursprungsort dieses Apicoplasts konnte die Familie der Algen beschrieben werden (Blanchard und Hicks, 1999; Kohler et al., 1997; McFadden et al., 1996; Wilson et al., 1996).

Ein interessanter Fund ist, daß die parasitäre ACAT eine starke Affinität zu Cholesterin besitzt. Im Vergleich dazu geht die parasitäre ACAT mit dem in Pflanzen üblichen Ergosterin, welches dort als Cholesterin-Analogon die sterische Beschaffenheit der Membranen stabilisiert, keine Reaktion ein (nicht dargestellte Beobachtung).

So reiht sich der apikalkomplexe *T. gondii* zwischen Pflanzen und höher entwickelten Organismen ein. Einmal schafft er sich eine klare Nähe zu Pflanzen durch hohe genetische Übereinstimmungen in verschiedenen Enzymen (Glucose-6-Phosphat Isomerase und Enolase (Dzierszinski et al., 1999; Waller et al., 1998)), andererseits integriert er Cholesterin in seine metabolischen Vorgänge; während im pflanzlichen Metabolismus Cholesterin keine Rolle spielt. Von den höheren Organismen unterscheidet er sich darin, daß er die Funktionen zweier in Säugern getrennt beschriebener Enzyme (ACAT und DGAT) in einem einzelnen Enzym vereint.

Wir wissen, daß *T. gondii* auxotroph für Cholesterin ist. Wird eine Wirtszelle mit *T. gondii* infiziert, kommt es in der Wirtszelle zu einem erhöhten Bedarf an Cholesterin, der sich in einer verstärkten Expression von LDL-Rezeptoren auf deren Oberfläche zeigt (Coppens et al., 2000). Veränderungen im Angebot von extrazellulärem Cholesterin werden vom Parasit nachvollzogen, dabei ist er fähig, vermehrt anfallendes

Cholesterin in Cholesterinester zu verestern und als Neutrallipide im Zytoplasma zu speichern. Neben den im Zytoplasma sichtbar akkumulierenden Lipidkörpern, kann eine verstärkte Aktivität des ACAT-Enzyms nachgewiesen, und auch eine erhöhte Expression des Enzyms festgestellt werden.

Anwendungen von ACAT-Inhibitoren zeigen keine signifikante Reduktion der Cholesterinestersynthese in *T. gondii*, ein anderer Effekt der Inhibitoren ist aber die verringerte Proliferation und Vitalität der Parasiten (auch beschrieben in: Sonda et al., 2001). Dieser Effekt ist aber nicht, wie Sonda et al referieren, eine Reaktion von *T. gondii* auf die verringerte Zufuhr von Cholesterin zum Parasiten (durch blockierte Wirtscholesterinestersynthese) zurückzuführen. Unter ACAT-Inhibitoreinwirkung ist die Cholesterinaufnahme im Parasit im Vergleich zu Kontrollparasiten sogar um 28% (DuP-128) und 73% (CI-976) gesteigert, wenngleich die Vitalität mit zunehmender Inhibitorenkonzentration abnimmt und geschädigte Parasiten zurückläßt.

Für *T. gondii* ist die Hauptquelle für Cholesterin die des aufgenommenen LDL, das in frühen Endosomen und Lysosomen hydrolisiert wird und dann Cholesterin freisetzt. Endogen synthetisiertes Cholesterin der Wirtszelle kann blockiert werden, ohne daß es in Replikationsunterschieden in *T. gondii* resultiert, genauso auch ist es nicht möglich daß Cholesterinester über die parasitäre Vakuolenmembran eingeschleust werden, da kein direkter Kontakt zwischen Wirtszelle und intrazellulärem *T. gondii* besteht und auch die Fusion von Wirtsvesikeln mit der PV nicht möglich ist (Coppens et al., 2000; Joiner et al., 1990). Diese Ergebnisse, zusammen mit den vorliegenden Beobachtungen der gesteigerten Cholesterinaufnahme unter ACAT-Inhibitoreinwirkung in *T. gondii*, deuten auf eine von der Wirtszellen-Cholesterinestersynthese unabhängige Cholesterinhomeostase in *T. gondii* hin.

Die Identifizierung einer ACAT cDNA in *T. gondii* hat eine bedeutende Tragweite für das Verständnis der Cholesterinesterbiosynthesenregulation und dem damit zusammenhängenden Lipidmetabolismus im Parasiten. Versuche, das Gen über Knockout-Strategie auszuschalten, waren bisher erfolglos (nicht veröffentlichte Ergebnisse), so daß anzunehmen ist, daß das *TgACAT* eine essentielle Rolle im Metabolismus des Parasiten einnimmt. Diese Entdeckung und das Wissen um die geringe genetische Übereinstimmung des Enzyms mit denen der höheren Organismen

prädisponieren es zu einem hervorragenden Ziel für neue Ansätze einer pharmakologischen Intervention.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Lipidmetabolismus von *T. gondii* untersucht. Die zentrale Frage der Arbeit war, welche Rolle Cholesterin im Lipidmetabolismus von *T. gondii* spielt.

Durch erhöhte Zufuhr von Cholesterin in den Zellkulturen wurde beobachtet, daß sich das Wachstum von *T. gondii* beschleunigen läßt, genauso wie sich durch Depletion des Metaboliten die Replikationsgeschwindigkeit des Parasiten verringert.

Mit der Klonierung des in *T. gondii* existierenden ACAT-Enzyms, welches vom Cholesterinangebot in Aktivität und Expression beeinflusst wird, wurde ein Enzym beschrieben, das lebensnotwendig für den Parasiten zu sein scheint und außerdem den ersten endogenen ER-Marker von *T. gondii* darstellt. Seine Funktion als Acyl-CoA: Cholesterin-Acyl-Transferase ließ sich nicht nur in *T. gondii*, sondern auch in Säugetierzellen, die dieses Enzym genetisch nicht exprimieren, nachweisen.

Der Versuch, das *Tg*ACAT mit Hilfe von humanen ACAT-Inhibitoren zu blockieren und damit die Parasitenreplikation zu behindern, zeigte nicht die erwartete Wirkung. Anstelle die Cholesterinesterproduktion einzuschränken, konnte sogar eine vermehrte Bildung von Cholesterinestern unter ACAT-Inhibitorenverwendung beobachtet werden. Dennoch zeigten sich neben der unerwarteten Cholesterinesterproduktion paradoxerweise Veränderungen der Mitochondrien und der parasitären Zellstrukturen, die auf die Lyse der Parasiten hinweisen.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit, daß das extrazelluläre Substratangebot in engem Zusammenhang mit der parasitären Cholesterinhomeostase steht, die unter anderem durch die *Tg*ACAT geregelt wird. Damit könnte sich die *Tg*ACAT als lohnendes Ziel für eine pharmakologische Intervention gegen den intrazellulären Parasiten erweisen.

7. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
BCA	Biochinic Säure Assay
bp	Basenpaare
cDNA	komplementierte DNA
CHO	Chinesische Hamster Ovar Zellen
cpm	gezählte radioaktive Zerfallsmomente pro Minute
CTP	Cytosintriphosphat
DAG	Diacylglycerin
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	fetales Rinderserum
g	Gravidität
GSH	Gluthation
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HDL	High Density Lipoprotein
HFF	menschliche Vorhautfibroblasten
HPL	highest purity level (Lösungsmittel/ Solvantien)
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration, bei der das Enzym in seiner Aktivität um 50% reduziert ist
IFA	indirekter Fluoreszenzassay
kDa	1000 Dalton
kV	Kilovolt
LDL	Low density lipoprotein
LPDS	Lipoprotein deficient serum, FBS, welches keine Lipoproteine enthält
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten

min.	Minute
MPA	Mykophenolsäure
mwc	molecular weight pores, Molekulargewichtsporen
nF	Nano – Farahd
ORF	open reading frame
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PV	parasitäre Vakuolenmembran
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen in der Minute
SDS	Sodiumdodezylsulfat
sek.	Sekunde
SSC	Sodium Sulfat Citrate
TAG	Triacylglycerol
TC ₅₀	Toxische Konzentration, bei der die Vitalität des Organismus nur zu 50% erhalten ist
TgACAT	ACAT-Enzym des Parasiten <i>Toxoplasma gondii</i>
TLC	Dünnschichtchromatographie
TMD	Transmembrandomäne
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

8. Literaturverzeichnis

- Ajioka, J.W.**, J.C. Boothroyd, B.P. Brunk, A. Hehl, L. Hillier, I.D. Manger, M. Marra, G.C. Overton, D.S. Roos, K.L. Wan, R. Waterston, and L.D. Sibley. 1998. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the *Apicomplexa*. *Genome Res.* 8:18-28.
- Aries, S.P.** und Kurowski, R. Infektionen. In: Renz-Polster, H., Braun, J., Editoren. Basislehrbuch Innere Medizin. Urban & Fischer, 2001. s. 1109
- Ashburn, D.** History and general epidemiology. In: Ho-Den, D.O., Joss, A.W.L., editors. Human toxoplasmosis. Oxford: Oxford University Press, 1992. pp. 1-25.
- Aspöck, H.**, and A. Pollak. 1992. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scand J Infect Dis Suppl.* 84:32-7.
- Belohradsky, B.H.** und Speer, C.P. Infektionskrankheiten und Neonatologie. In: Koletzko, B., Editor. von Harnack Kinderheilkunde. 2000. s. 108-109, 284.
- Blanchard, J.L.**, and J.S. Hicks. 1999. The non-photosynthetic plastid in malarial parasites and other apicomplexans is derived from outside the green plastid lineage. *J Eukaryot Microbiol.* 46:367-75.
- Bocan, T.M.**, S.B. Mueller, P.D. Uhlendorf, R.S. Newton, and B.R. Krause. 1991. Comparison of CI-976, an ACAT inhibitor, and selected lipid-lowering agents for antiatherosclerotic activity in iliac-femoral and thoracic aortic lesions. A biochemical, morphological, and morphometric evaluation. *Arterioscler Thromb.* 11:1830-43.
- Bogorad, I.**, Haliwell, B., Hooper, J.K. Chloroplasts and Photosynthesis. In: Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., editors. Molecular Biology of the Cell. 1989 Garland Publishing. 1989. pp 366-380
- Boothroyd, J.C.** 1993. Population biology of *Toxoplasma*: clonality, virulence, and speciation (or not). *Infect Agents Dis.* 2:100-2.

- Bouvier-Nave, P.**, P. Benveniste, A. Noiriél, and H. Schaller. 2000. Expression in yeast of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase cDNA from *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Soc Trans.* 28:692-5.
- Brasaemle, D.L.**, D.M. Levin, D.C. Adler-Wailes, and C. Londos. 2000. The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta.* 1483:251-62.
- Brown, M.S.**, and J.L. Goldstein. 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11041-8.
- Cadigan, K.M.**, J.G. Heider, and T.Y. Chang. 1988. Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell mutants deficient in acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity. *J Biol Chem.* 263:274-82.
- Carruthers, V.B.**, and L.D. Sibley. 1997. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 73:114-23.
- Chang, C.C.**, J. Chen, M.A. Thomas, D. Cheng, V.A. Del Priore, R.S. Newton, M.E. Pape, and T.Y. Chang. 1995. Regulation and immunolocalization of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase in mammalian cells as studied with specific antibodies. *J Biol Chem.* 270:29532-40.
- Chang, T.Y.**, C.C. Chang, and D. Cheng. 1997. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem.* 66:613-38.
- Charron, A.J.**, and L.D. Sibley. 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 115:3049-59.
- Cheng, D.**, C.C. Chang, X. Qu, and T.Y. Chang. 1995. Activation of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase by cholesterol or by oxysterol in a cell-free system. *J Biol Chem.* 270:685-95.
- Cintra, W.M.**, and W. de Souza. 1985. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the cell membranes of *Toxoplasma gondii*. *Eur J Cell Biol.* 37:63-9.

- Coppens, I.,** A.P. Sinai, and K.A. Joiner. 2000. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol.* 149:167-80.
- Coppens, I.,** 2001. Expert reviews in molecular Medicine, Cambridge University Press. (www-ermm.cbcu.cam.ac.uk)
- Doolittle, G.M.,** and T.Y. Chang. 1982a. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in Chinese hamster ovary cells. Enzyme activity determined after reconstitution in phospholipid/cholesterol liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 713:529-37.
- Doolittle, G.M.,** and T.Y. Chang. 1982b. Solubilization, partial purification, and reconstitution in phosphatidylcholine-cholesterol liposomes of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *Biochemistry.* 21:674-9.
- Dubey, J.P.** 1991. Toxoplasmosis--an overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 22 Suppl:88-92.
- Dubey, J.P.,** D.S. Lindsay, and C.A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 11:267-99.
- Dubey, J.P.,** Beattie, C.P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.
- Dzierszynski, F.,** O. Popescu, C. Toursel, C. Slomianny, B. Yahiaoui, and S. Tomavo. 1999. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans. *J Biol Chem.* 274:24888-95.
- Field, F.J.,** E. Albright, and S. Mathur. 1991. Inhibition of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity by PD128042: effect on cholesterol metabolism and secretion in CaCo-2 cells. *Lipids.* 26:1-8.
- Fölsch, H.,** M. Pypaert, P. Schu, and I. Mellman. 2001. Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 152:595-606.
- Foulon, W.,** A. Naessens, and M.P. Derde. 1994. Evaluation of the possibilities for preventing congenital toxoplasmosis. *Am J Perinatol.* 11:57-62.

- Foussard, F.**, Y. Gallois, A. Girault, and J.F. Menez. 1991a. Lipids and fatty acids of tachyzoites and purified pellicles of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 77:475-7.
- Foussard, F.**, M.A. Leriche, and J.F. Dubremetz. 1991b. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology.* 102 Pt 3:367-70.
- Gallois, Y.**, F. Foussard, A. Girault, J. Hodbert, A. Tricaud, G. Mauras, and C. Motta. 1988. Membrane fluidity of *Toxoplasma gondii*: a fluorescence polarization study. *Biol Cell.* 62:11-5.
- Goldstein, J.L.**, and M.S. Brown. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343:425-30.
- Guo, Z.**, D. Cromley, J.T. Billheimer, and S.L. Sturley. 2001. Identification of potential substrate-binding sites in yeast and human acyl-CoA sterol acyltransferases by mutagenesis of conserved sequences. *J Lipid Res.* 42:1282-91.
- Harte, R.A.**, S.J. Yeaman, B. Jackson, and K.E. Suckling. 1995. Effect of membrane environment on inhibition of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase by a range of synthetic inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 1258:241-50.
- Hofmann, K.** 2000. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci.* 25:111-2.
- Hoppe, H.C.**, and K.A. Joiner. 2000. Cytoplasmic tail motifs mediate endoplasmic reticulum localization and export of transmembrane reporters in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2:569-78.
- Huff, M.W.**, D.E. Telford, P.H. Barrett, J.T. Billheimer, and P.J. Gillies. 1994. Inhibition of hepatic ACAT decreases ApoB secretion in miniature pigs fed a cholesterol-free diet. *Arterioscler Thromb.* 14:1498-508.
- Joiner, K.A.**, S.A. Fuhrman, H.M. Miettinen, L.H. Kasper, and I. Mellman. 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science.* 249:641-6.
- Joiner, K.A.**, and D.S. Roos. 2002. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol.* 157:557-63.
- Joyce, C.W.**, G.S. Shelness, M.A. Davis, R.G. Lee, K. Skinner, R.A. Anderson, and L.L. Rudel. 2000. ACAT1 and ACAT2 membrane topology segregates a serine

residue essential for activity to opposite sides of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell*. 11:3675-87.

- Junquero, D.**, P. Oms, E. Carilla-Durand, J. Autin, J. Tarayre, A. Degryse, J. Patoiseau, F.C. Colpaert, and A. Delhon. 2001. Pharmacological profile of F 12511, (S)-2',3', 5'-trimethyl-4'-hydroxy-alpha-dodecylthioacetanilide a powerful and systemic acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor. *Biochem Pharmacol*. 61:97-108.
- Köhler, S.**, C.F. Delwiche, P.W. Denny, L.G. Tilney, P. Webster, R.J. Wilson, J.D. Palmer, and D.S. Roos. 1997. A plastid of probable green algal origin in *Apicomplexan* parasites. *Science*. 275:1485-9.
- Krauß, T.**, W. Straube, S. Wiersbitzky, V. Hitz, and A. Kewitsch. 1993. [Screening for toxoplasmosis in pregnancy--a pilot program in Northeast Germany]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 53:613-8.
- Lange, Y.**, H. Duan, and T. Mazzone. 1996. Cholesterol homeostasis is modulated by amphiphiles at transcriptional and post-transcriptional loci. *J Lipid Res*. 37:534-9.
- Lange, Y.**, J. Ye, and J. Chin. 1997. The fate of cholesterol exiting lysosomes. *J Biol Chem*. 272:17018-22.
- Lee, R.G.**, M.C. Willingham, M.A. Davis, K.A. Skinner, L.L. Rudel. 2000. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. *J Lipid Res*. 41:1991-2001.
- Leport, C.**, and J.S. Remington. 1992. [Toxoplasmosis in AIDS]. *Presse Med*. 21:1165-71.
- Levine, N.D.** 1988. Progress in taxonomy of the *Apicomplexan* protozoa. *J Protozool*. 35:518-20.
- Li, B.L.**, X.L. Li, Z.J. Duan, O. Lee, S. Lin, Z.M. Ma, C.C. Chang, X.Y. Yang, J.P. Park, T.K. Mohandas, W. Noll, L. Chan, and T.Y. Chang. 1999. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) gene organization and evidence that the 4.3-kilobase ACAT-1 mRNA is produced from two different chromosomes. *J Biol Chem*. 274:11060-71.

- Liendo, A.**, T.T. Stedman, H.M. Ngo, S. Chaturvedi, H.C. Hoppe, and K.A. Joiner. 2001. *Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense granule proteins. *J Biol Chem.* 276:18272-81.
- Lin, S.**, D. Cheng, M.S. Liu, J. Chen, and T.Y. Chang. 1999. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 in the endoplasmic reticulum contains seven transmembrane domains. *J Biol Chem.* 274:23276-85.
- Liscum, L.**, and N.J. Munn. 1999. Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* 1438:19-37.
- Londos, C.**, D.L. Brasaemle, C.J. Schultz, J.P. Segrest, and A.R. Kimmel. 1999. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 10:51-8.
- Luft, B.J.**, and J.S. Remington. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* 15:211-22.
- McFadden, G.I.**, M.E. Reith, J. Munholland, and N. Lang-Unnasch. 1996. Plastid in human parasites. *Nature.* 381:482.
- Mordue, D.G.**, S. Hakansson, I. Niesman, and L.D. Sibley. 1999. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol.* 92:87-99.
- Murphy, D.J.**, and J. Vance. 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci.* 24:109-15.
- Nakaar, V.**, C.J. Beckers, V. Polotsky, and K.A. Joiner. 1998. Basis for substrate specificity of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *Mol Biochem Parasitol.* 97:209-20.
- Nicolle, C.**, Manceaux, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. CR Hebd Séances Acad Sci 1908; 147: 763-6.
- Olivier, L.M.**, and S.K. Krisans. 2000. Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1529:89-102.
- Pelletier, L.**, C.A. Stern, M. Pypaert, D. Sheff, H.M. Ngo, N. Roper, C.Y. He, K. Hu, D. Toomre, I. Coppens, D.S. Roos, K.A. Joiner, and G. Warren. 2002. Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 418:548-52.

- Pfefferkorn, E.R.**, and L.C. Pfefferkorn. 1977. Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J Protozool.* 24:449-53.
- Phillips, M.C.**, W.J. Johnson, and G.H. Rothblat. 1987. Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim Biophys Acta.* 906:223-76.
- Pol, A.**, R. Luetterforst, M. Lindsay, S. Heino, E. Ikonen, and R.G. Parton. 2001. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol.* 152:1057-70.
- Quittnat, F.**, Y. Nishikawa, T.T. Stedman, D.R. Voelker, J.Y. Choi, M.M. Zahn, R.C. Murphy, R.M. Barkley, M. Pypaert, K.A. Joiner, I. Coppens. 2004. On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.*138(1): 107-122
- Remington, J.S.** 1990. The tragedy of toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J.* 9:762-3.
- Remington, J.S.**, Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S., Klein, J.O., editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 3rd ed Philadelphia: WB Saunders, 1990. pp. 89-195.
- Rodriguez, A.**, P.S. Bachorik, and S.B. Wee. 1999. Novel effects of the acyl-coenzyme A:Cholesterol acyltransferase inhibitor 58-035 on foam cell development in primary human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2199-206.
- Roos, D.S.**, R.G. Donald, N.S. Morrissette, and A.L. Moulton. 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol.* 45:27-63.
- Roos, D.S.**, G.K. Donald, L.M. Fohl, G.G. Reynolds, B. Striepen. *Toxoplasma* as a model for *Plasmodium*. Transport and trafficking in the transfected erythrocyte. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium).1999. 226; pp 177- 198
- Seitz, H.M.**, Maier, W. Parasitologie. In: Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H.J., Pulverer, G. Medizinische Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag. 1994. s. 655- 657.

- Sonda, S.**, L.M. Ting, S. Novak, K. Kim, J.J. Maher, R.V. Farese, Jr., and J.D. Ernst. 2001. Cholesterol esterification by host and parasite is essential for optimal proliferation of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 276:34434-40.
- Tenter, A.M.**, A.R. Heckerth, and L.M. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30:1217-58.
- Hu, K.**, T. Mann, B. Striepen, C.J. Beckers, D.S. Roos, J.M. Murray. 2002. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell.* 13:593-606.
- Voet, D.** und Voet, J.G. Lipid Metabolism. In: Biochemistry. John Wiley and Sons. 1990. pp. 618- 675
- Waller, R.F.**, P.J. Keeling, R.G. Donald, B. Striepen, E. Handman, N. Lang-Unnasch, A.F. Cowman, G.S. Besra, D.S. Roos, and G.I. McFadden. 1998. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:12352-7.
- Wilson, R.J.**, P.W. Denny, P.R. Preiser, K. Rangachari, K. Roberts, A. Roy, A. Whyte, M. Strath, D.J. Moore, P.W. Moore, and D.H. Williamson. 1996. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol.* 261:155-72.

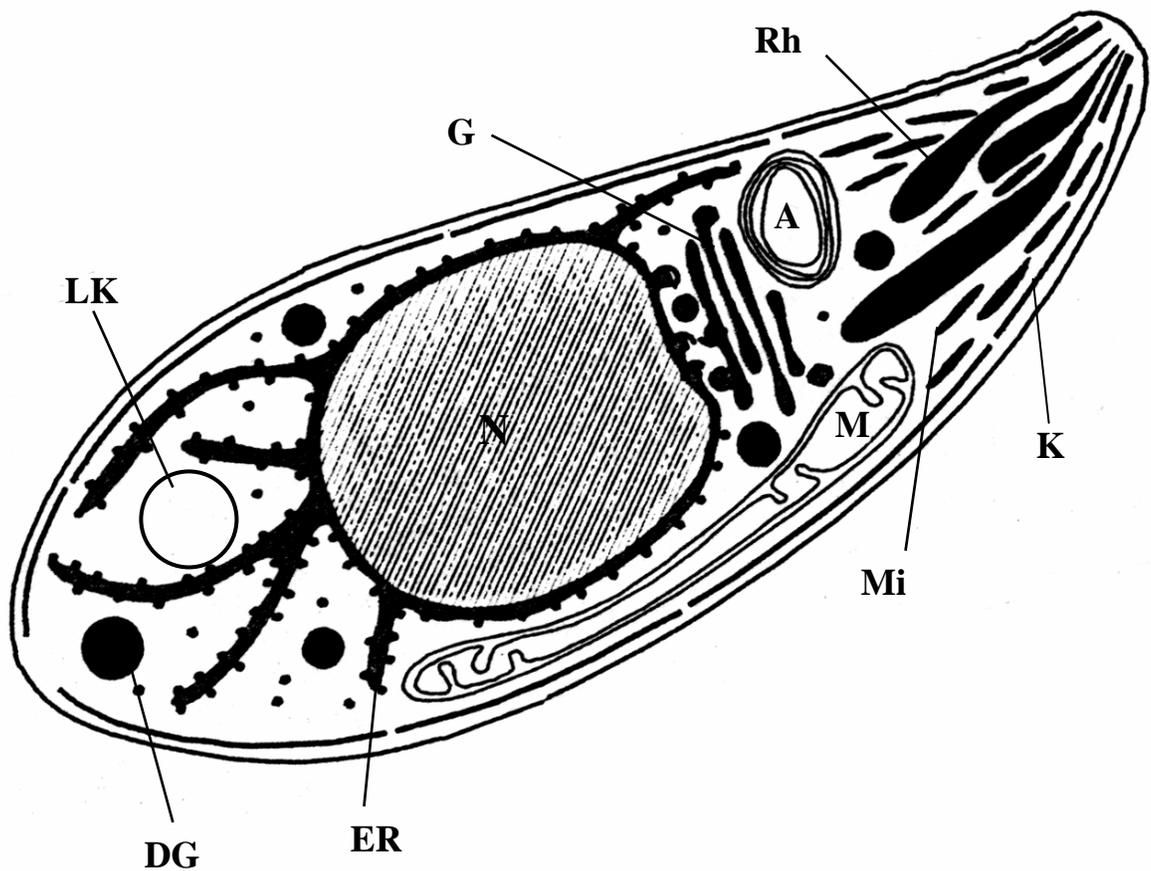


Abb.1 *Toxoplasma gondii* (adaptiertes Schema aus Roos et al. 1999).

Ein einzelner Parasit ohne parasitophore Vakuole (PV). Im apikalen Anteil findet sich der apikale Komplex, bestehend aus Rhoptrien (Rh) und Mikronemen (Mi), die als sekretorische Organellen mit an der Bindung an die Wirtszelle und Eindringen in dieselbe beteiligt sind (Carruthers und Sibley, 1997; Joiner und Roos, 2002).

Dem Apikoplast (A) wird mit seinen mehr als 3 Membranen der Status eines Pflanzenrelikts eingeräumt, ähnliche Gebilde, die Chromoplasten, finden sich in Pflanzenzellen (Aries und Kurowski, 2001; Bogorad et al., 1989; Seitz und Maier, 1994).

Das Kinetochor (K) stabilisiert mit seinen tubulären Strukturen, die entlang der Zellmembran verlaufen, die äußere Form des *T. gondii*. Die „Dense granules“ (DG) liegen als reife sekretorische Organellen gleichmäßig auf das anteriore und posteriore Kompartiment verteilt. Sie sind maßgeblich an der intrazellulären Replikation beteiligt (Joiner und Roos, 2002; Mordue et al., 1999).

In unmittelbarer Nähe zum Nukleus (N) liegt ein einzelnes Mitochondrium (M) und ein Golgi-Apparat mit 3-5 Sacculi (Pelletier et al., 2002). Das Endoplasmatische Retikulum (ER) umgibt den Nukleus und erstreckt sich über das gesamte Zytoplasma. Von ihm sprossen die Lipidkörper (LK) ab (Liscum und Munn, 1999).

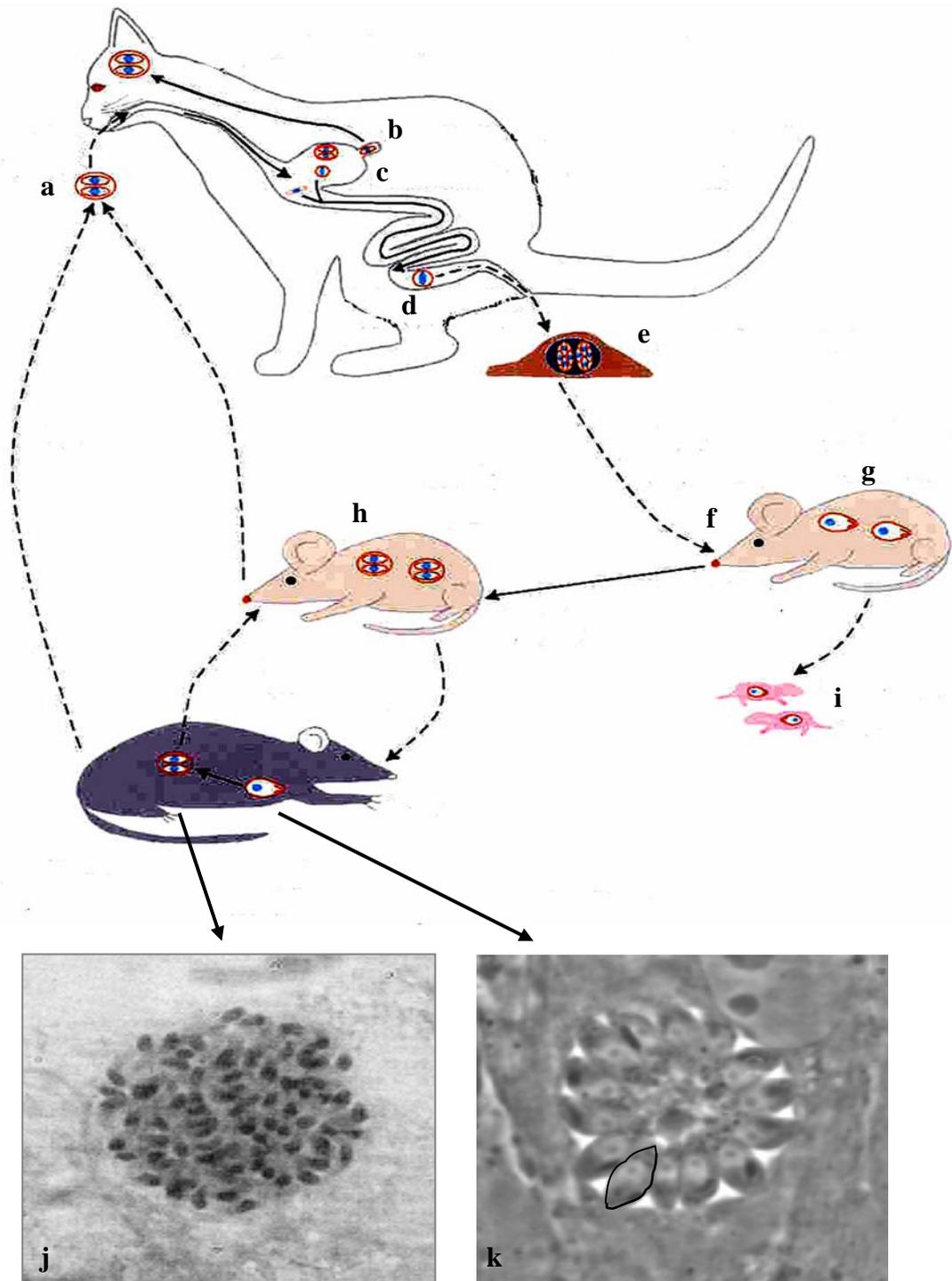
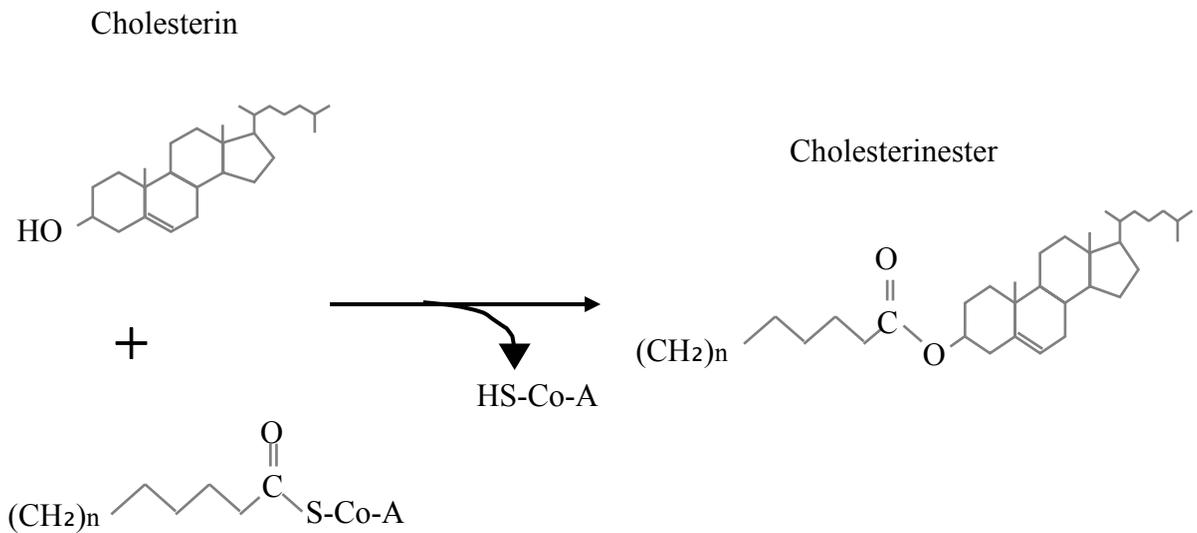


Abb. 2 Lebenszyklus von *T. gondii*. (a) Orale Aufnahme einer Gewebszyste in einen Feliden, dem Endwirt *T. gondii*. (b) Invasion der Enterozyten. (c) Gametenbildung. (d) Oozystenbildung. (e) Sporozoitenformation. (f) Aufnahme in den Zwischenwirt. (g) Akute Infektion: Umwandlung der Sporozoiten in Tachyzoiten, die asexuelle Parasitenform. (h) Chronische Infektion, Gewebszystenbildung, Replikation durch Endodyogenie. (j) Persistierende Gewebszyste im gesunden Organismus mit langsam replizierenden Bradyzoiten. (k) Parasitäre Vakuole; schematische Umrandung: ein *Toxoplasma gondii*. (i) Kongenitale, diaplazentare Transmission, (adaptierte Darstellung Coppens und Joiner, 2001).



mit Co-A aktivierte Fettsäuren

Abb. 3 Schema. Enzymatische Reaktion der Substrate Cholesterin und CoEnzym A aktivierte Fettsäure mit Cholesterinesterbildung unter Abspaltung von CoEnzym A. Katalysator der Reaktion: die AcylCoA: CholesterinAcyltransferase.

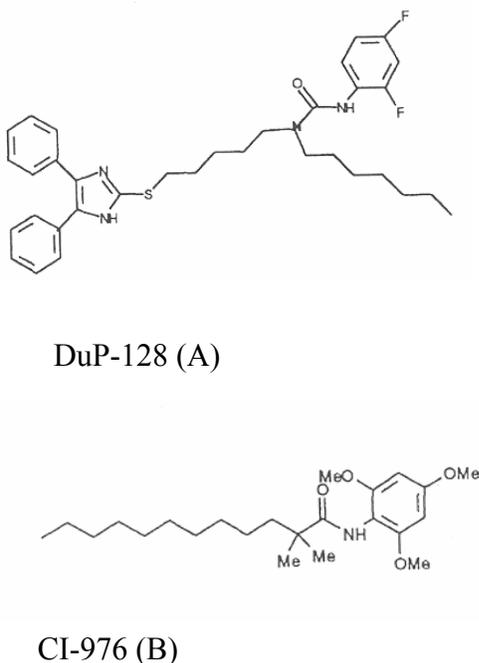


Abb. 4 ACAT - Inhibitoren. Strukturformeln der ACAT-Inhibitoren DuP-128 (A) und CI-976 (B) (Junquero et al, 2001). Der genaue Inhibitionsmechanismus von DuP-128 ist bisher nicht bekannt, CI-976 wirkt durch kompetitive Hemmung des Enzyms. Beide Substanzen greifen nur in die Cholesterinesterproduktion ein. Cholesterinaufnahme, sowie Cholesterinbewegungen innerhalb der Zelle von Lysosomen und Membranen werden nicht beeinflusst (Rodriguez, 1999).

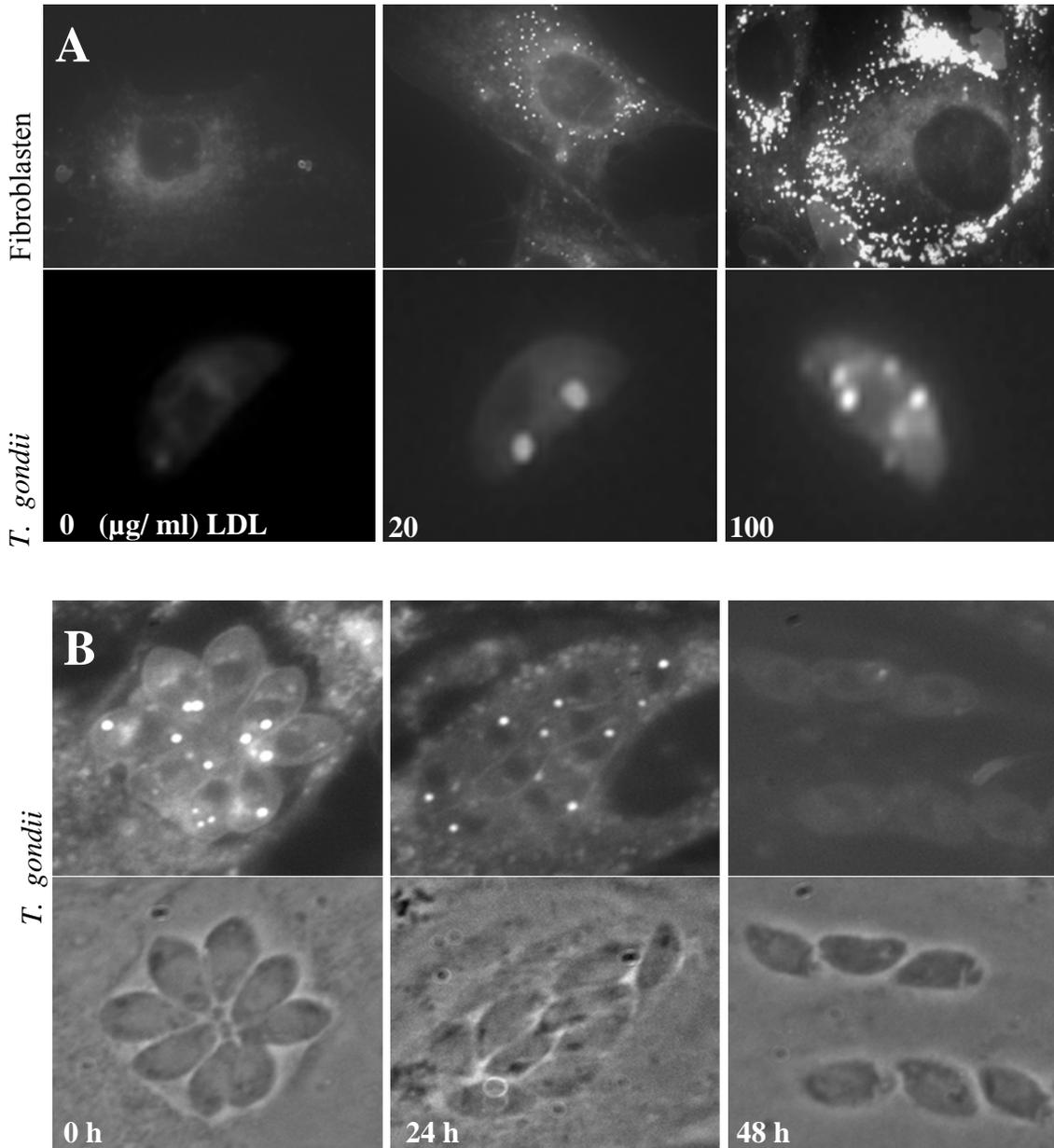


Abb. 5 (A) Obere Bilderreihe: Die Fibroblasten wurde über 24 h ohne, mit 20 µg/ml und 100 µg/ml LDL inkubiert. Deutlich zeigt sich eine Vermehrung der Lipidkörperanzahl bei steigender LDL - Konzentration, hier mit Oil Red O angefärbt. Untere Bilderreihe: *T. gondii*, die unter gleichen Bedingungen wie die Fibroblasten inkubiert wurden. Auch hier ist die Zunahme der angefärbten Lipidkörper von der LDL - Konzentration abhängig. (B) Obere Bilderreihe: *T. gondii* (intrazellulär) im Fluoreszenzlicht, untere Bilderreihe: die gleichen Bilder in Phasenkontrastaufnahme. *T. gondii* wurden in LDL - freiem Medium über 48 h inkubiert. Die Bilder wurden zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h angefertigt. Deutlich zu sehen sind die mit Oil Red O gefärbten Lipidkörper, die in Abhängigkeit zur Inkubationszeit an Größe und Zahl abnehmen.

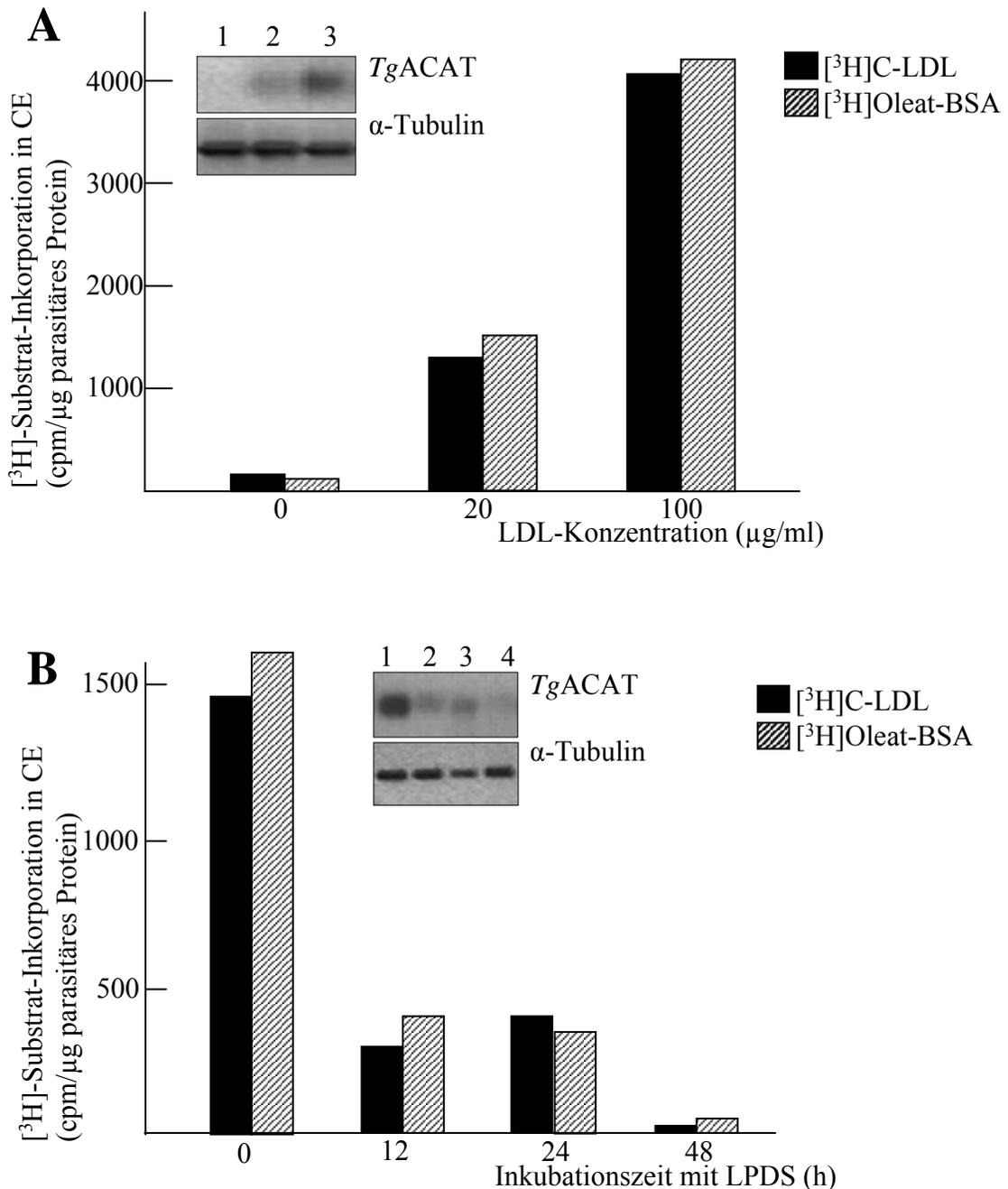


Abb. 6 (A) zeigt, wie sich die Inkorporation von radioaktiven Substraten in Cholesterinester in Abhängigkeit zur extrazellulären LDL-Konzentration verändert. Ohne LDL im Medium finden sich Werte von 172 ± 11 cpm (Cholesterininkorporation: [C]) und 109 ± 20 cpm (Oleatinkorporation: [O]), bei $20 \mu\text{g/ml}$ LDL ergeben sich 1290 ± 23 cpm [C] und 1518 ± 18 cpm [O], bei $100 \mu\text{g/ml}$ LDL finden sich 4027 ± 51 cpm [C] und 4172 ± 34 cpm [O]. (B) zeigt wie sich die Cholesterinesterproduktion von *T. gondii* über die Zeit verringert, wenn die Parasiten in LDL-freiem Medium inkubiert werden. Zeitpunkt 0 h 1560 ± 31 cpm [C], 1700 ± 42 cpm [O], nach 12 h 300 ± 9 cpm [C], 416 ± 14 cpm [O]; 24 h 410 ± 23 cpm [C], 363 ± 13 cpm [O]; nach 48 h 26 ± 7 cpm [C] und 60 ± 4 cpm [O]. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt, dabei wurden die radioaktiven Zerfallsmomente (cpm) ins Verhältnis zum gemessenen Parasiten Protein gesetzt.

PfACAT	1	MNNKNDEGQKLRKRLYENYKINQTSLLSLSLSLEIDMKGFNLIIIICTHFRILENFKKYGLIIRPKNCDLVKNLPLFCFISLHVITIF
YeastACAT	1	---MDKKDLLENQFLRIQKLNAAADAGKROSITVDDG--EYIG--LDTSGNSPANBHT---ATTITQNHVSVVANGD-----
hACAT	1	---MVGEKMSLRNRLSKSRNPEEDEDQRNPAKESLET-----PSNGRIDIK-----QLIAKIKIKLTAEEEL-----
TgACAT	1	-----MSVVSKRRENNGS---GPVTPDIGE-----TS--H-LK-----RESIVAKSL-----
consensus	1
PfACAT	96	SWFIERYVTSWNYTCIDEDDQHTFKNIPMDLSEKNTDMIIEKKNYKSLYPNLIRKKKN---NTINNDNENNN--NNNNNNNN--NSNNNNNN
YeastACAT	70	-----VAFIPGTATEDNTEIVTEEVLEDDNMFKTHVKLSKE-K---ARYRQSSNFISYPDDMSFEHRPSILDGSVNEPFKTKFVGP TL
hACAT	62	----K---PFFMKVGGSHFDVFTN-LIEKSASLDNGGCALTFS-----VLEGEKNN--HRAKDLRAPPEQGLTAEEELKPFKKEVGS HF
TgACAT	38	-----WR-----Q-QDIT--RLEELQRQHEEERAK--E-----R-RQ-----NSYDDLRTPLR--SVDGSRRP--SVVN--DIN
consensus	96
PfACAT	183	NNNNNNNNNNNNNNNANCLHKD--PPSLYSYDSNTTYENEPYDKFDKDNSTYDKCKDKDILCD----KDKSQTCNDICKKLLK--ELKNNTBK
YeastACAT	153	EKEIRRREKELMAMRKNLHHRKSSDAVDSVEKNDG-AAPTTPTAATSETVVTVETTILSSNFSGLYVAFWMAAFGAVKALIDYYQHNGSFK
hACAT	140	DDFVTNLIIEKSASLDNGGCALT--TFSVLEGEKNN-HRAKDLRAPPEQGIKIFLARR-SLDE----LLEVHIRTIIYHMFIALILFILTSTLVV
TgACAT	93	DYRGRPLHDQLHGAYR-----ATLSSHHT---KNLNLRF--LN-LFF----LILF----VINFRMVTNLMMEYGL---MIRLPSRFR
consensus	191*
PfACAT	269	N-----NNNNNNNYINTCAHNIHHT--TKDDISTSSCLKKKKVKVHGWKS---FHLISIFLRCINSIFILFPLLT-ISYYDTEPTLSSI
YeastACAT	247	DSEILKFMTTNLFVAVSVDLLMYLSTYF--VVG--TQYLCKWGVLKWGTGWIIFTSIYEFLVPIFYMYLTENILKHWLSKIFLFLSHLVLMLK
hACAT	226	D-----YDEGRVLLEFSLLSYAFGKIPVTVWVWMLFSTFVVPYFLFQHWATG-YKSSHPILRSIFHGLFMIHQIG-VLGEQPTYVVLAY
TgACAT	159	D-----HLSNWP--MLLCFLLMHFC--ILG-----AFVIER--FVAANVPH-LLDWSSECVIGLNFLLVFIIVPLT-VCNSSPSPAASAL
consensus	286*
PfACAT	351	LLTISLV---W-FKFFYSFHEVCYEAARKLHENVDLK-----NLIEDDLSEMY--YIKRYPCLDKSYYVILMPTMCFQFYVPRVEKIR
YeastACAT	337	MHSFAFYNGYLWGIKEELQFKSAIAKYKDSINDPKWIGALEKSCFPCSFELSSQLSDQTQKFPNNTSAKSEFFWTFMPTLIYQIEVPRKELR
hACAT	313	TLPASR-----FIIIFEQIRFVMKAHSFVRENVP-----RVLNS--AKEKS--STVPIP---TVNQVLYELFAPTLIYRDSVPRNETVR
TgACAT	231	LLAFSLV---W-LFKLFSFHEVCLDARRALRDGDNFR-----ELCSN--SEAE--HVRRYPYSITLRHLTYFIWPTMCFQFYVPRVPIR
consensus	381**
PfACAT	432	WIHVAKHIFEVILLIMIKISDQYMFITVENTFMKEFTSAHFSVKITHIIRMLKVSIPTHYIWLIGLIVFHHWCNLAELTRFGDRLFYKD
YeastACAT	432	WSYVLEKICAIPTGLFLMMDAQILMYPVAMRALAVRNSEWTGLDRLLKWVGLLVDIVPGFIVMYILDFYLIWDAILNCVAELTRFGDRMFYGD
hACAT	386	WGYVAMKFAQVFGCFEYVYVIFERICAPLFR--NIQOE--PFSARVL--VLCVFNLSILPGVLLFLEFFAFHCLWLNFAFAMLRFGDRMFYLD
TgACAT	310	WLSVIRHVFESAACLALMKIIVDQHIVPVARNSFTITEMQSIPLSTLLVHFLDKITRLSIPNLYVWLLMEVGLFHHWCNLAELTRFGDRFYLD
consensus	476	* * * * * * * * * *
PfACAT	527	WVNASSFAEYWRKWNLPYFVCRHIN-KPLIYV-GIHRNVSMIVFFISAMLHEVLSIPLKLGFTGYIFFAFICQIPLVQFTNNAVFKKHKTI
YeastACAT	527	WNVCSWADFSRIWNPVHKFLRHVYHSSMSEF-KLNKSOATMTFFLSSVVEHLYMYVIFKCLR-FYLEFFQMLQMLPLVALTNTKSMRNRTII
hACAT	473	WVNSTSYSNYYRTWNVVVDWYIYAYKDFLWFSKRFKSAAMLAFAVSAVVEYALAVCLSFYVPLFVLEMFVGMAFNFIWVDSRKK---PI
TgACAT	405	WVNASSFGYWRKWNLPVHFLNRHIN-KPLRRA-RFPRIVATSVVFLISALLHEYMITVPLQLGWTVGVFLGFMQAQPLTYITNLSFEQRNPTV
consensus	571	*** * * * * * * * * *
PfACAT	620	GNSIFWIVFCFTGQPLILFIYYLWID-----KQGTLLKN-----
YeastACAT	620	GNVIFWLGICMG--PSVMCTLYLTF-----
hACAT	565	WNVLMNTSLFLGN-GVLLCFVSOEYARRHCPLKNPFLDYVRRSRWTCRYVF
TgACAT	498	GNCFFWFIKFCFSGQPLGILIIYWLWGV-----KHGTVQQLDPSKIQIM----
consensus	666	* * * * * * * * *

Abb. 7 Vergleich verschiedener ACAT-Sequenzen

★ und die schwarze Unterlegung benennen die Übereinstimmungen aller vier Sequenzen, • und graue Hinterlegung weist auf Ähnlichkeiten der cDNA hin, ✨ ✨ (H/YSF) steht für das invariablen Serine mit der potentiellen Bindungsstelle für Cholesterin, ‡ für die in ACAT und DGAT - Enzymen erhaltene potentielle Fettsäurebindungsstelle, sowie □ für das invariable Histidin der Überfamilie der membrangebundenen O-Acyltransferasen.

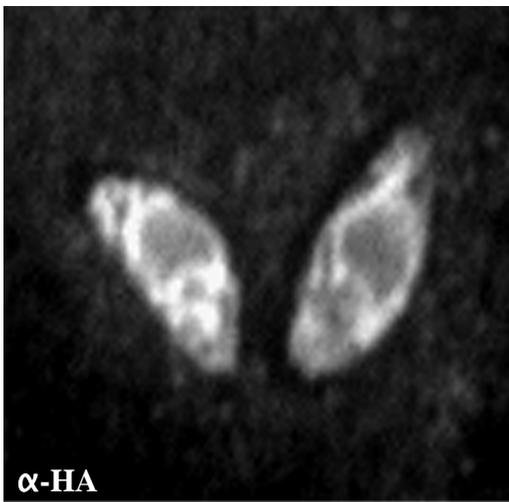
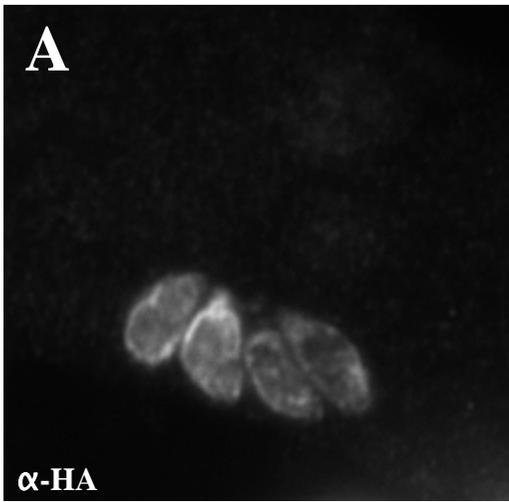
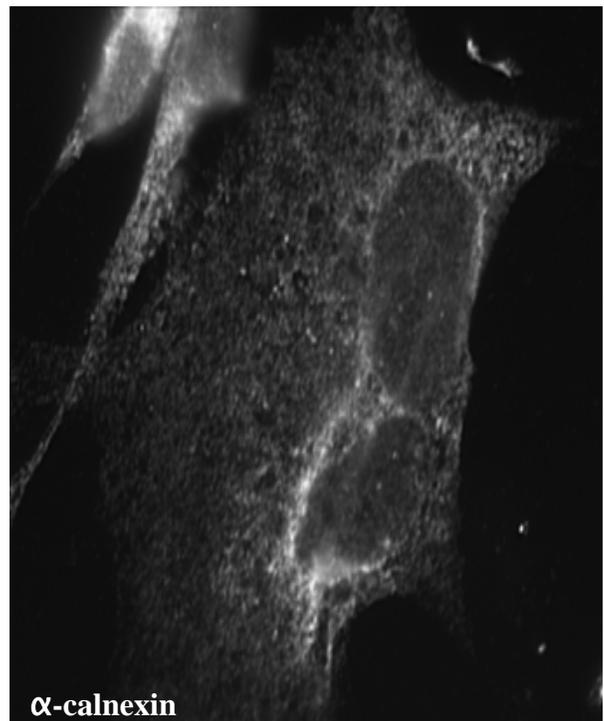
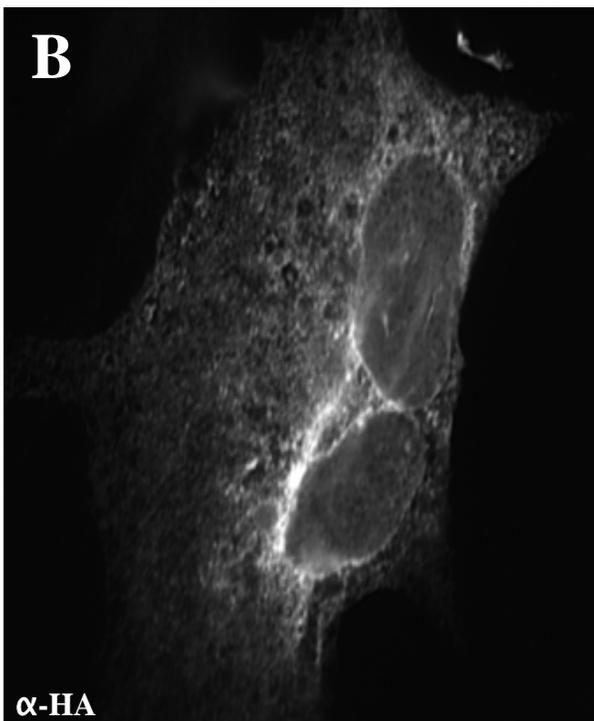


Abb. 9 (A) zeigt *T. gondii*, welches mit *TgACAT* - HA transfiziert wurde. Die Parasiten wurden im Immunfluoreszenzassay aufgearbeitet. Unter Fluoreszenzlichtmikroskopie (FITC) zeigt sich ein dichtes fluoreszierendes Signal um den ausgesparten Nukleus, das sich über das gesamte Zytoplasma des Parasiten erstreckt. (B) MEF $-/-$ ACAT Zellen wurden transient mit dem *TgACAT* - HA transfiziert und nach IFA unter Immunfluoreszenzlichtmikroskopie betrachtet. Das linke Bild zeigt die Lokalisation des *TgACAT* - HA, detektiert durch den monoklonalen und dem HA - Antikörper, das rechte Bild zeigt das ER mit einem monoklonalen Calnexin-Antikörper, der als ER-Marker in Säugetieren verwendet wird. Beide Antikörper zeigen fast vollständig identische Signalausbreitung der Marker in derselben Zelle (Überlagerung nicht gezeigt).



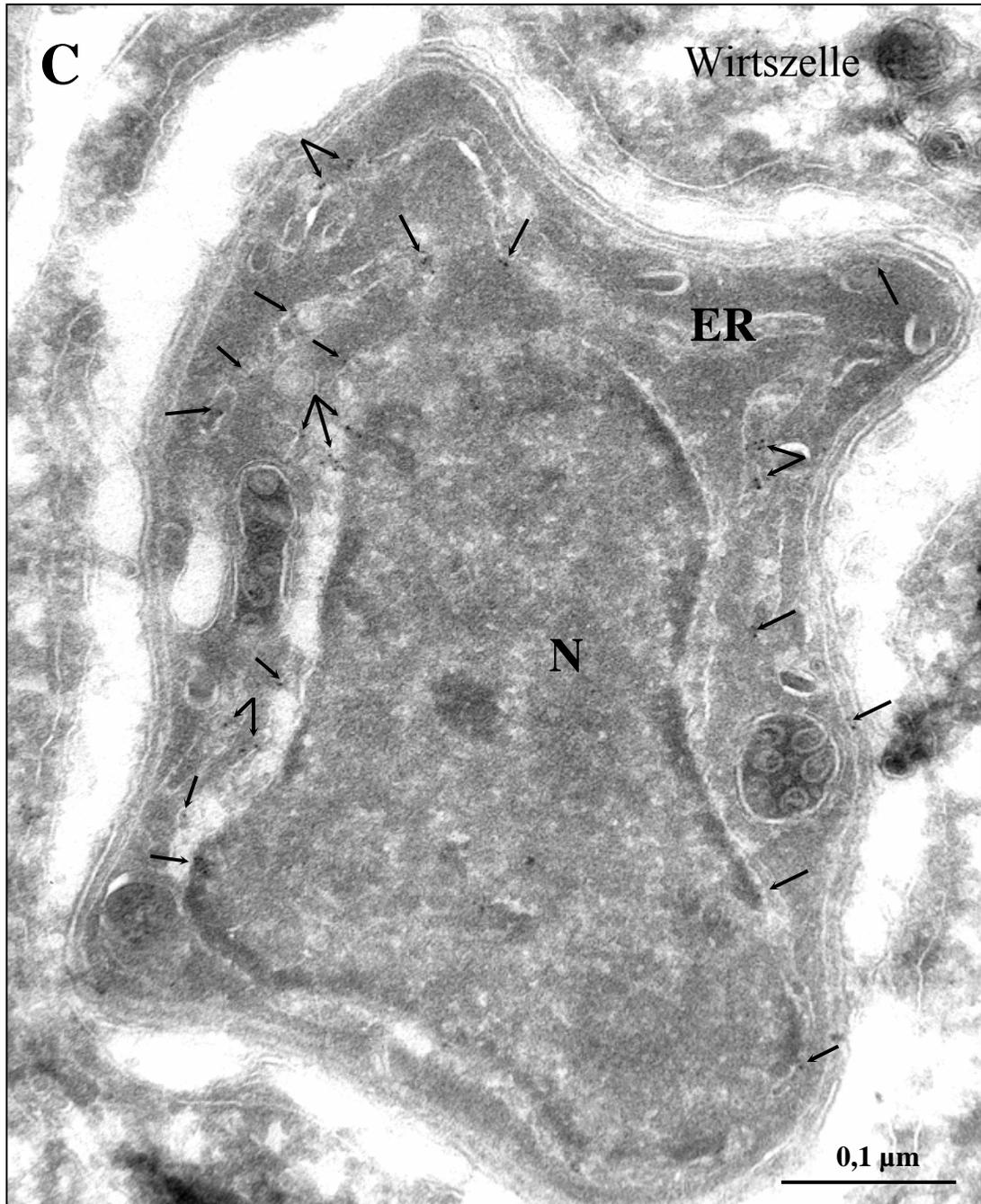


Abb. 9 (C) Immunoelektronenmikroskopie. *T. gondii* wurde mit den *TgACAT-HA* transfiziert und zu einer stabilen Mutantenzellreihe selektiert. Die in dieser Darstellung angewandte Immunlokalisation wurde mit dem HA - Antikörper durchgeführt, an den kleine Goldpartikel ($\text{\O} 5\text{nm}$) assoziiert sind. **N** zeigt den Nukleus des Parasiten, **ER** die tubulären Strukturen des parasitären ER. \rightarrow Sind auf die Goldpartikel gerichtet, die sich ausschließlich an ER-Strukturen finden lassen.

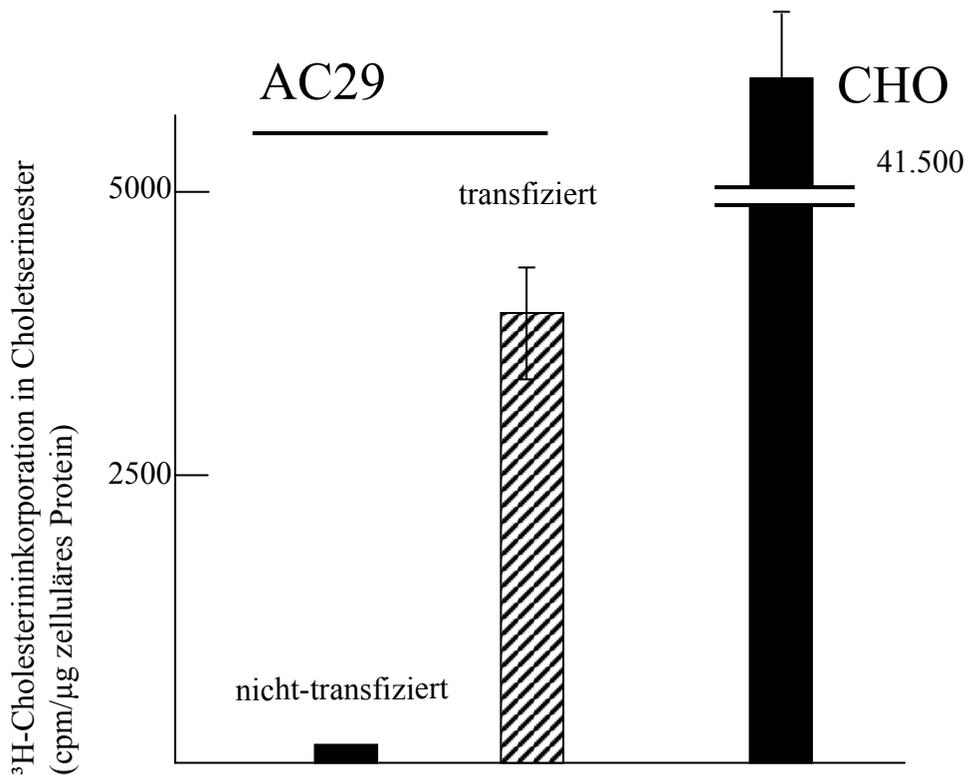


Abb.10 zeigt ein Diagramm der *de novo* Synthese von Cholesterinestern in AC29 Zellen, die mit dem TgACAT - HA transfiziert wurden. Normalerweise sind diese Zellen nicht fähig, selbst Cholesterinester zu bilden. In nichttransfizierten AC29 ließ sich ein Wert von 180 cpm/ μg zelluläres Protein erheben. Transient transfizierte AC29 Zellen zeigten im Vergleich eine radioaktive Cholesterininkorporation in Cholesterinester von 3900 ± 420 cpm. CHO Zellen, die als vergleichende Kontrolle von nichtmutierten Zellen benutzt wurde, haben eine stärkere Potenz, Cholesterin in Cholesterinester zu Inkorporieren (41500 ± 600 cpm). Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt, dabei wurden die radioaktiven Zerfallsmomente (cpm) ins Verhältnis zu den gemessenen zellulären Proteinen (in μg) gesetzt.

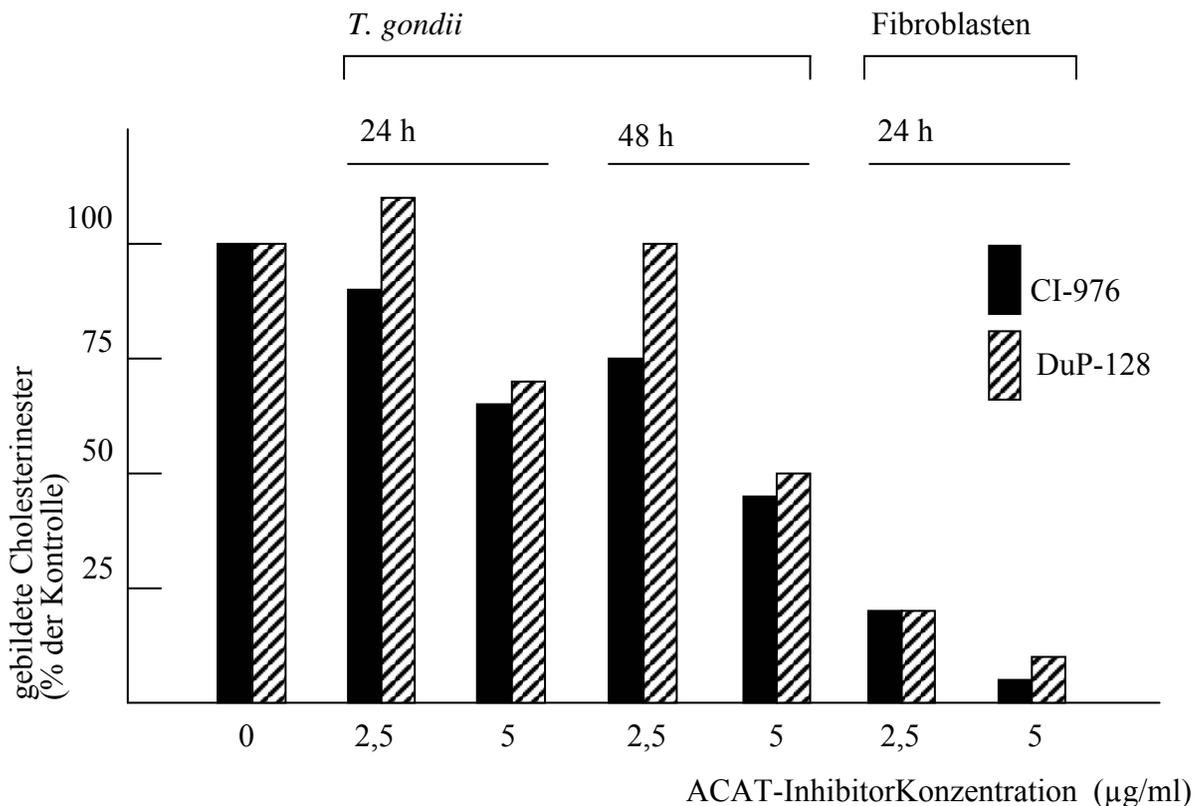


Abb. 11 zeigt die gebildeten Cholesterinester in *T. gondii* unter ACAT-Inhibitorenbehandlung. Die Werte verringern sich mit zunehmender Inhibitorkonzentration, genauso auch mit fort-dauernder Inkubationslänge. In den hier vorgestellten Versuchen ist die Wirtszellen-ACAT in ihrer Leistungsfähigkeit auf unter 25% normalen Potenz Inhibiert, die Vitalität der Wirtszellen ist mit 98 - 100% nicht eingeschränkt. Die Werte der gemessenen Cholesterinesterbildung (cpm/ µg parasitäres Protein) wurden ins Verhältnis zu den Werten von gebildeten Cholesterinestern von intrazellulären Kontrollparasitenkulturen und Kontrollzellkulturen gesetzt, und in Prozent zur Kontrollkultur auf der Y-Achse aufgetragen.

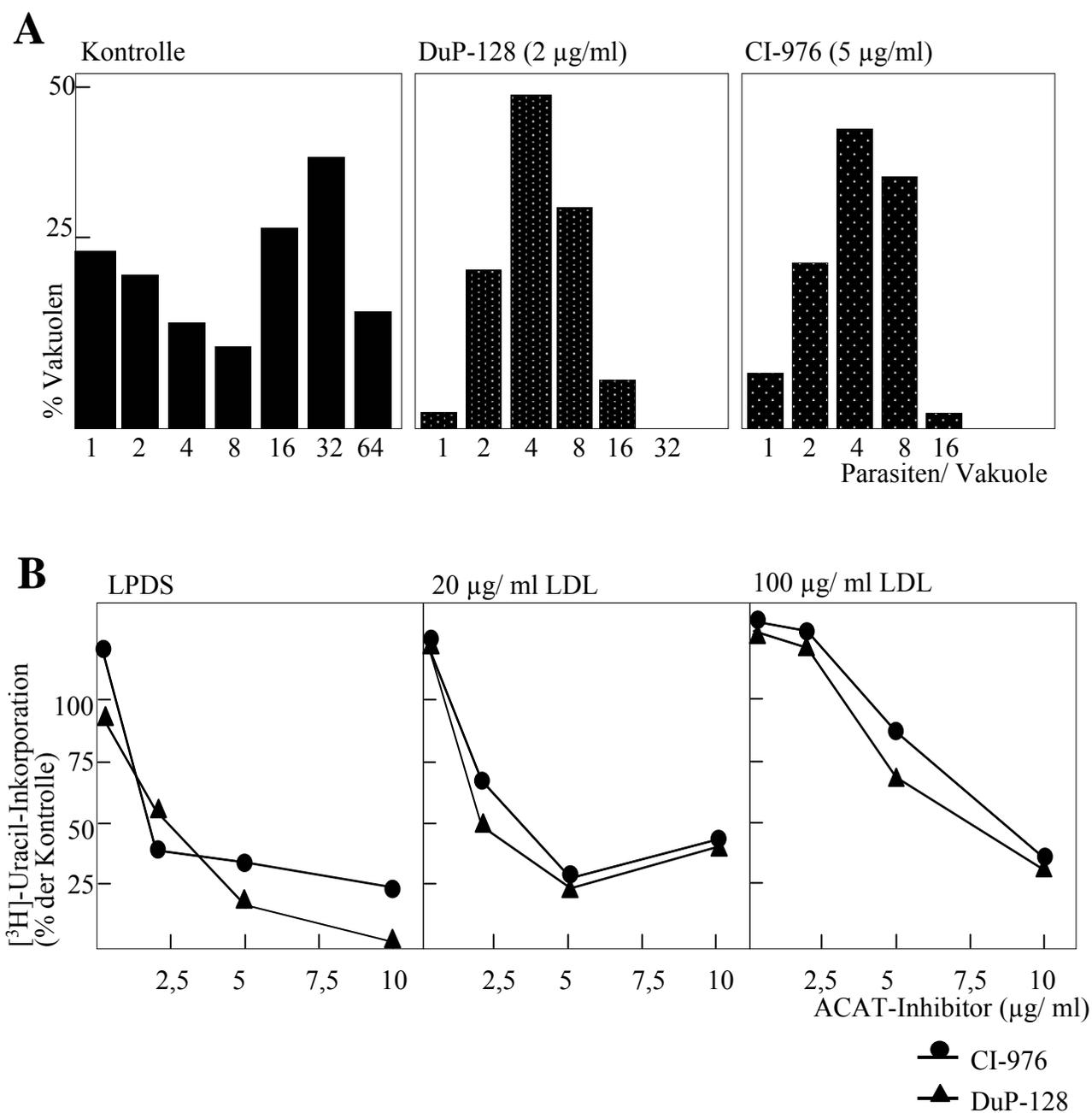
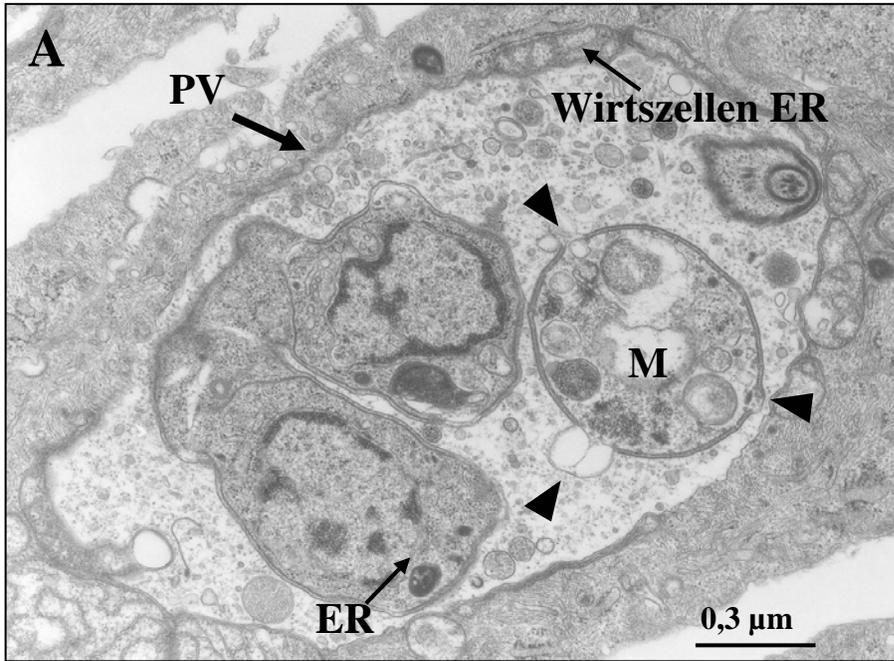
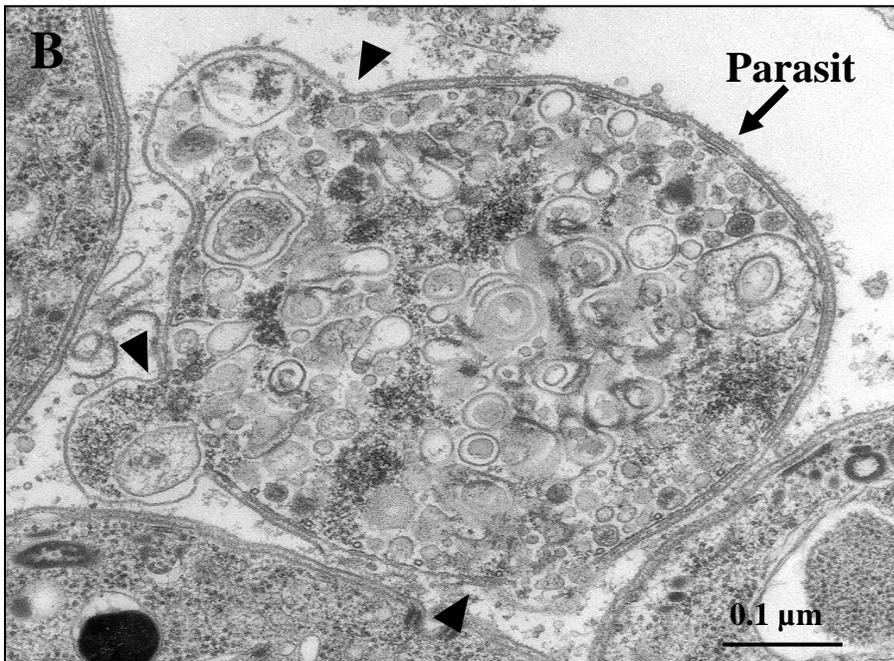


Abb. 12 (A) Parasiten pro parasitäre Vakuole. Im linken Bild ist zu sehen, wieviele *T. gondii* sich nach einer Inkubationszeit von 48 h unter Standardbedingungen in einer Vakuole befinden. Vakuolen mit einzelnen Parasiten indizieren, daß es in der Kultur bereits zu einzelnen Lysen einzelner Vakuolen durch starke Replikation der Parasiten gekommen ist und eine erneute Invasion der *T. gondii* in weitere Wirtszellen stattgefunden hat. Im Vergleich dazu die Parasitenkulturen unter ACAT-Inhibitoreinwirkung (Mitte und rechts, deren Replikationsgeschwindigkeit eingeschränkt zu sein scheint). (B) Vitalitätsbestimmungen an in ACAT - Inhibitoren inkubierten *T. gondii* mit verschiedenen LDL-Konzentrationen im Medium über 24 h. Trotz höherer Vitalitätsrate der Parasiten unter 100 µg/ ml LDL in geringen ACAT - Inhibitorkonzentrationen, nimmt die Vitalität von *T. gondii* mit Konzentrationserhöhung der Inhibitoren beständig ab.



DuP-128



CI-976

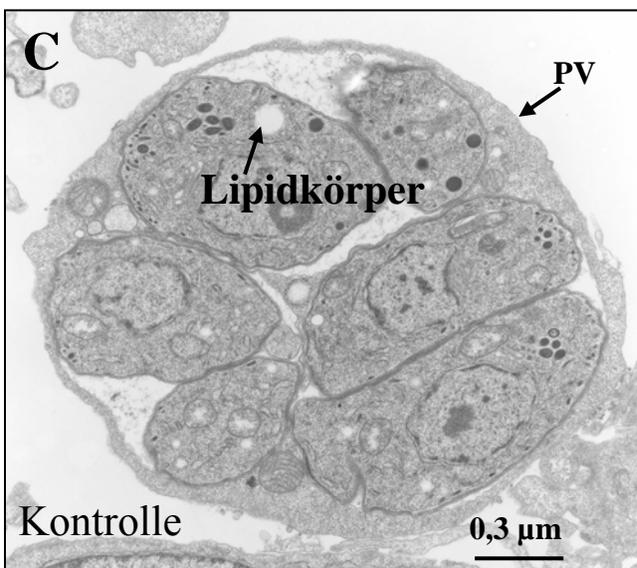


Abb. 13 Elektronenmikroskopie. (A) wurde mit 2 µg/ml DuP-128 und (B) mit 5 µg/ml CI-976 über 24 h inkubiert. Die EM-Bilder zeigen neben riesigen Mitochondrien **M**, ein unverändertes ER, erhaltene parasitäre Vakuolenmembranen, multiple Lücken in der *T. gondii* Membran. Detritus ist über den gesamten Intravakuolären Raum verteilt. (C) zeigt vitale Kontroll-Parasiten.

Eine Anmerkung zum Schluß oder
die **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen denjenigen bedanken, die mir bis hierher geholfen haben:
Eine Idee zu suchen, zu finden, sie zu entwickeln und sie umzusetzen.

Angefangen bei meinen Eltern, die mich in der Idee bestärkten, tatsächlich in die USA
zu gehen, Achim Kaasch, der mir von Keith erzählte, bei meinem Doktorvater
Professor Frosch, der mir unbesehen seine Betreuung zusicherte, bei Frau Professor
Moll, die sich bereit erklärte, als meine Koreferentin zu fungieren.

Keith Joiner und den Parasiten und seinem Labor; Isabelle Coppens, Ross Sussman,
Tim Stedman, Alex Osanya, Pavlina Baevova, Huan Ngo mit Bayfield und diejenigen,
die dazu beigetragen haben, die Zeit in Yale zu einem prägenden Lebensabschnitt
werden zu lassen: Sebastien, Suzan, Sharon, Manu, Shu Yuan, Corinna, Markus,
James, Guille.

Um nicht zuletzt Laurence Pelletier zu nennen, der mir auch jetzt noch tagtäglich zeigt,
wie begeisternd und vielseitig und herausfordernd kleine krabbelnde Tierchen und
Zellen sein können.

Curriculum vitae

Friederike Susanne Quittnat

Tochter der Eheleute Helga und Prof. Dr. Joachim Quittnat
geboren 09.07.1975 in Pforzheim/ Baden-Württemberg
ledig, keine Kinder

Ärztin

10.2004 – jetzt Medizinische Klinik und Poliklinik III
der Carl Gustav Carus Universitätsklinik Dresden,
Schwerpunkt Nephrologie

Approbation zur Ärztin

10.2004

Ärztin im Praktikum

01.2004 – 09.2004 Medizinische Klinik und Poliklinik III
der Carl Gustav Carus Universitätsklinik Dresden,
Schwerpunkt Nephrologie

Studium der Medizin

10.2002 – 11.2003 Praktisches Jahr,
Carl Gustav Carus Universitätsklinik Dresden
3. Staatsexamen an der Universität Dresden
Gesamtnote: sehr gut

04.1996 – 09.2002 Studium der Humanmedizin,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2. Staatsexamen an der Universität Würzburg
Gesamtnote: gut

(unterbrochen durch Forschungsaufenthalt in den USA,
School of Medicine, Yale University)

Schulbildung

1982-1995 Goetheschule Freie Waldorfschule Pforzheim
Abitur 1995, Gesamtnote: 2,1