

**Untersuchungen zur Topologie der
Glycosylphosphatidylinositol-
Biosynthese in *Toxoplasma gondii***

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jürgen Kimmel
aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn, 2004

☞ ✓ □ ☺ ☹ ■ ■ ✖ ◆ ◆ ■ Ω ☝ ● ✖ ■ ☹

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am **22.07.2004** angenommen.

Erstgutachter: **Herr Prof. Dr. Klaus Lingelbach**

Zweitgutachter: **Herr Prof. Dr. Ralph T. Schwarz**

Tag der mündlichen Prüfung am: **15.12.2004**

Wissenschaftliche Publikationen

Originalarbeiten:

de Macedo, C.S., Gerold, P., Jung, N., Azzouz, N., Kimmel, J. und Schwarz, R.T. (2001) Inhibition of glycosyl-phosphatidylinositol biosynthesis in *Plasmodium falciparum* by C-2 substituted mannose analogues. *Eur J Biochem*, **268**, 6221-8.

Klabunde, J., Uhlemann, A.C., Tebo, A.E., Kimmel, J., Schwarz, R.T., Kreamsner, P.G. und Kun, J.F. (2002) Recognition of *Plasmodium falciparum* proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. *Parasitol Res*, **88**, 113-7.

Kimmel, J., Ogun, S.A., de Macedo, C.S., Gerold, P., Vivas, L., Holder, A.A., Schwarz, R.T. und Azzouz, N. (2003) Glycosylphosphatidyl-inositols in murine malaria: *Plasmodium yoelii yoelii*. *Biochimie*, **85**, 473-81.

Kimmel, J., Azzouz, N., Gerold, P., Seeber, F., Lingelbach, K., Dubremetz, J.-F. und Schwarz, R.T. (2005). On the topology and transient acylation of the *Toxoplasma gondii* glycosyl-phosphatidylinositols. Manuskript in Vorbereitung

ein weiteres Manuskript (Smith, T.K., Kimmel, J., Azzouz, N., de Macedo, C.S. und Schwarz, R.T.) befindet sich in der Planung

Poster:

Kimmel, J.*, Ogun, S.A., Holder, A.A., Schwarz, R.T. und Gerold, P. (1996). "Glycosyl-phosphatidylinositol lipids synthesised by erythrocytic stages of *Plasmodium yoelii*". 10th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases; 11.-15. September 1996, Hannover

Kimmel, J.*, Ogun, S.A., Holder, A.A., Schwarz, R.T. und Gerold, P. (1996). "Glycosyl-phosphatidylinositol lipids synthesised in culture and a cell-free system by erythrocytic stages of *Plasmodium yoelii*". 8th Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Groupe Lillois de Glycobiologie & the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie; 09./10. Dezember 1996, Rauschholzhausen

Kimmel, J., Berhe, S., Gerold, P., Ogun, S.A., Vivas, L., Holder, A.A. und Schwarz, R.T.* (1996). "Glycosylation in Plasmodia". Keystone Symposia Conference on Molecular and Cellular Biology of Apicomplexan Protozoa; 07.-12. Januar 1997, Park City, Utah, USA

Kimmel, J.*, Ogun, S.A., Holder, A.A., Gerold, P. und Schwarz, R.T. (1997). "*Plasmodium yoelii* glycosyl-phosphatidylinositol lipids: a novel potential protein anchor". 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie; 24.-28. März 1998, Dresden

Kimmel, J.*, Ogun, S.A., Ferguson M.A.J., Holder, A.A., Gerold, P. und Schwarz, R.T. (1998). "*Plasmodium yoelii* glycosyl-phosphatidylinositol lipids: a novel potential protein anchor". 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biochemie und Mikrobiologie; 27.-30. September 1998, Jena; [*Biol. Chem.* **379** (supplement), p85]

Kimmel, J., Gerold, P., Bangs, J., Dubremetz, J.-F. und Schwarz, R.T.* "Topology of glycosylphosphatidylinositol anchor assembly in subcellular membranes of *Toxoplasma gondii*". 28th Steenbock Symposium, 12. – 14. August 2000, Madison, Wisconsin, USA

Kimmel, J., Gerold, P., Bangs, J., Seeber, F., Lingelbach, K., Dubremetz, J.-F. und Schwarz, R.T.* "Topology of glycosylphosphatidylinositol anchor assembly in subcellular membranes of *Toxoplasma gondii*"
Toxo-Meeting, München 2000

Kimmel, J.*, Gerold, P., Bangs, J., Seeber, F., Lingelbach, K., Dubremetz, J.-F. und Schwarz, R.T. "Distribution of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic intermediates in subcellular membranes of *Toxoplasma gondii*"
Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology, 20. – 23. März 2002, Lübeck-Travemünde

Vorträge:

Schwarz, R.T.*, Gerold, P., Schmidt, A., Kimmel, J., Striepen, B., Zinecker, C.F., Damm, J.B.L., Melgers, P.A.T., Koolen, M., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G., Dubremetz, J.F. und Holder, A.A. "On the structure and biosynthesis of the Glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii* and Plasmodia."
Vortrag auf dem Annual Meeting of the Society for Glycobiology; 23.-26. November 1996, Boston, USA

Gerold, P., Berhe, S., Kimmel, J., Ogun, S.A., Vivas, L., Holder, A.A., Freiberg, N. und Schwarz, R.T.* "Glycosyl-Phosphatidylinositols in Plasmodia".
Vortrag auf der Gordon Research Conference on Glycobiology; 02.-07. Februar 1997, Harbortown Marina Resort, Ventura, USA

Gerold, P., Berhe, S., Kimmel, J., Schmidt, A., Schuppert, A., Ogun, S.A., Vivas, L., Tachado, S.D., Blackmann, M.J., Bause, E., Holder, A.A., Schofield, L. und Schwarz, R.T.*
Vortrag auf dem European Carbohydrate Symposium; 06.-11. July 1997, Utrecht, Niederlande

Gerold, P., Azzouz, N., Kedees-Kelaid, M., Berhe, S., Kimmel, J., Schmidt, A., Eckert, V., Zinecker, C.F., Blaschke, T., Shams-Eldin, H., Schmidt, J., Jung, N., Ibrahim, M., Ogun, S.A., Tachado, S.D., Mühlberger, E., Becker, S., Capdeville, Y., Dubremetz, J.-F., Holder, A.A., Schofield, L., Klenk, H.-D. und Schwarz, R.T.* "GPIs of parasitic protozoa: expression and elements of regulation".
5th International Symposium on Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules; 04.-08. Januar 1999, Bangalore, Indien

Kimmel, J.*, Gerold, P., Striepen, B., Dubremetz, J.-F. und Schwarz, R.T. "Membrane topology of glycosylphosphatidylinositol anchor assembly in *Toxoplasma gondii*".
19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie; 28. März – 01. April 2000, Stuttgart-Hohenheim

Azzouz N, Debierre-Grockiego, F., Gerold, P., Rauscher, B., Shams-Eldin, H., Santos de Macedo, C., Tachado, S., Striepen, B., Zinecker, C. F., Kimmel, J., Damm, J. B. L., Melgers, P. A. T., Gerwig, G. J., Vliegthart, J. F. G., B., Koolen, M., Geyer, H., Geyer, R., Cesbron-Delauw, M.-F., Dubremetz, J.-F., Holder, A.A., Schofield, L. und Schwarz, R. T.* "Glycolipids of Apicomplexan Protozoa".
COST-B9 Expert Meeting on antiprotozoal chemotherapy, Lipids, membranes and protozoal parasites, 01. – 02. Februar 2002, Utrecht, The Netherlands, Abstract Book pp. 21-22

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	<i>Toxoplasma gondii</i> – eine Einführung	2
2.2	Systematik	2
2.3	Morphologie	3
2.4	Entwicklungszyklus und Übertragungswege	5
2.5	Toxoplasmose	7
2.6	Glykosylphosphatidylinositole	9
2.7	Funktion und Bedeutung der GPIs	10
2.8	Struktur und Vorkommen der GPIs	12
2.9	GPIs und das "Low Molecular Weight Antigen" von <i>T. gondii</i>	13
2.10	GPI Biosynthese und Topologie	15
2.11	Zielsetzung der Arbeit	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Geräte, Plastikwaren, Enzyme, Feinchemikalien, Medien und Radioisotope	19
3.1.1	Geräte	19
3.1.2	Plastikwaren	20
3.1.3	Enzyme	20
3.1.4	Chemikalien	20
3.1.5	Radioaktive Substanzen	20
3.2	<i>In vitro</i> -Kultivierung von <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	21
3.3	Permeabilisierung von <i>T. gondii</i> -Zellen	21
3.3.1	Behandlung mit Streptolysin O (nach Bhakdi <i>et al.</i> , 1993)	21
3.3.2	Behandlung mit Saponin	22
3.3.3	Behandlung mit Streptolysin O (Chaturvedi <i>et al.</i> , 1999; mod. nach Ikonen <i>et al.</i> , 1995)	22
	Bestimmen der Streptolysin O-Aktivität	22
	Permeabilisierung von <i>T. gondii</i> mit Streptolysin O	23
3.3.4	Behandlung mit Digitonin	23
3.3.5	Behandlung mit hypotonem Puffer	23
3.3.6	Überprüfen der Permeabilisierung (Propidiumjodid-Färbung)	24
3.4	Markierung von GPI-Biosyntheseintermediaten	25
3.4.1	Markierung früher GPI-Biosyntheseintermediate (Markierung mit UDP-[³ H]GlcNAc)	25
3.4.2	Markierung höher glycosylierter und modifizierter GPI-Biosyntheseintermediate (Markierung mit GDP-[³ H]Man, UDP-[³ H]GalNAc und UDP-[³ H]Glc)	25
3.5	Behandlung mit PI-PLC	26

3.6	Kontrollen zur Integrität der permeabilisierten Parasiten	26
3.6.1	β-Galactosidase-Test	26
3.6.2	Protease-Schutztest	27
3.6.3	Elektronenmikroskopie	27
3.7	SDS-Gelelektrophorese	28
3.8	Färbung von SDS-Gelen mit Silbernitrat (AgNO ₃)	29
3.9	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose/PVDF-Membran und immunologische Färbung (Western-Blot)	30
3.9.1	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose oder PVDF-Membran	30
3.9.2	Coomassie-Färbung der Markerspur	30
3.9.3	Inkubation mit Antikörpern	31
	Färbung auf Nitrocellulose	31
	Färbung auf PVDF-Membran	31
3.10	Markierung mit tritiiertem Glucosamin	32
3.11	Markierung mit sulfuriertem Methionin	32
3.12	Extraktion von Glycolipiden	32
3.12.1	Ein-Schritt-Extraktion von Glycolipiden (mod. nach McDowell und Schwarz, 1988)	33
3.12.2	Zwei-Schritt-Extraktion von Glycolipiden (mod. nach Field und Menon, 1992)	34
3.13	Dünnschichtchromatographie	34
3.13.1	Vorbereiten der Dünnschichtplatten	34
3.13.2	DC-Systeme zur Analyse von Glycolipiden	34
	Laufmittelsystem A	35
	Laufmittelsystem B	35
3.13.3	Detektion und Quantifizierung von Radioaktivität auf DC-Platten	35
3.13.4	Statistische Auswertung der Spaltungseffizienz	35
3.14	Charakterisierung von Glycolipiden als GPIs	36
3.14.1	Identifizierung von GPIs mittels enzymatischer Behandlungen	36
3.14.2	Charakterisierung von GPIs mittels spezifischer Hydrolysen	38
	Spaltung durch salpetrige Säure	38
	Alkalische Hydrolysen (Gerold <i>et al.</i> , 1994; mod. nach Menon <i>et al.</i> , 1990b)	39
	Spaltung durch wässrige Flußsäure und Darstellung neutraler Glycane (Gerold und Schwarz, 2002)	39
3.15	Analyse der intakten Core-Glycane von GPIs	40
3.16	Darstellung von Dextranhydrolysat (Yamashita <i>et al.</i> , 1982)	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Etablierung eines Systems zur Permeabilisierung von <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten	42
4.1.1	Behandlung mit Streptolysin O (mod. nach Bhakdi <i>et al.</i> , 1993) permeabilisiert <i>T. gondii</i> nicht	42
4.1.2	Behandlung mit Saponin zerstört die Zellstruktur	44

4.1.3	GDP-[³ H]Man-markierte Glycolipide lassen sich in Streptolysin O-behandelten Parasiten nicht mit PI-PLC spalten (mod. nach Chaturvedi <i>et al.</i> , 1999)	46
4.1.4	Hypoton permeabilisierte, nicht aber Streptolysin O-behandelte <i>T. gondii</i> -Zellen lassen sich effektiv durch radioaktive Nukleotidzucker markieren	48
4.1.5	Hypoton permeabilisierte Toxoplasmen behalten ihre Zellmembran	51
4.1.6	Permeabilisierte Toxoplasmen haben eine intakte GPI-Biosynthese	51
4.1.7	Cytoplasmatische Proteine werden nach hypotoner Permeabilisierung freigesetzt	53
4.1.8	Zellkompartimente werden durch die Behandlungen nicht zerstört	56
4.1.9	Ultrastrukturelle Darstellung von Toxoplasmen nach hypotoner Permeabilisierung	58
4.1.10	Geeignete Inkubationsbedingungen für die PI-PLC Spaltung	60
4.1.11	PI-PLC Spaltung in Abhängigkeit von der Zeit	62
4.1.12	PI-PLC Spaltung in Abhängigkeit von der Konzentration	63
4.2	Charakterisierung von <i>T. gondii</i> Glycolipiden	65
4.2.1	<i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -markierte Glycolipide von <i>T. gondii</i> haben auf der DC unterschiedliche Laufeigenschaften	65
4.2.2	Identifizierung von <i>T. gondii</i> -Glycolipiden	67
4.2.2.1	Charakterisierung nach UDP-[³ H]GlcNAc-Markierung	67
4.2.2.2	Charakterisierung nach GDP-[³ H]Man-Markierung	69
4.2.2.3	Charakterisierung nach UDP-[³ H]GalNAc- und UDP-[³ H]Glc-Markierung	71
4.2.2.4	Analyse von Core-Glycanen	74
4.3	Untersuchungen zur Topologie der GPI-Anker-Biosynthese	76
4.3.1	Untersuchung früher GPI-Biosyntheseintermediate (UDP-[³ H]GlcNAc-Markierung)	76
4.3.2	Untersuchung mannosylierter GPI-Biosyntheseintermediate (GDP-[³ H]Man-Markierung)	81
4.3.3	Untersuchung modifizierter GPI-Biosyntheseintermediate (UDP-[³ H]Glc-Markierung)	83
4.4	Die Glycolipide von <i>T. gondii</i> und ihre Orientierung in der ER-Membran – eine Zusammenfassung	87
5	Diskussion	89
6	Abkürzungsverzeichnis	102
7	Literatur	103

1 Zusammenfassung

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulär lebendes, parasitisches Protozoon mit großer medizinischer Bedeutung vor allem in zwei Fällen: Zum einen bei Erstinfektion während einer Schwangerschaft, hier kann es zur Schädigung des Fötus kommen, zum anderen als opportunistischer Krankheitserreger bei immunsupprimierten Patienten (z. B. AIDS), hier kann eine Reaktivierung von Dauerstadien zum Tod führen. Einen Ansatzpunkt zur Bekämpfung der Parasiten stellt ein spezieller Stoffwechselweg dar, die Glycosylphosphatidylinositol- (GPI-) Biosynthese. GPIs bestehen aus einer konservierten hydrophilen Glycan-Grundstruktur, die durch Seitenketten modifiziert werden kann, und einem hydrophoben Inositol-Phospholipid. Wie bei einer Vielzahl anderer parasitärer Protozoen sind auch bei *T. gondii* die Hauptoberflächenproteine durch GPIs in der Zelloberfläche verankert, eine Blockierung der GPI-Biosynthese führt zum Absterben der Parasiten. Um bei therapeutischen Ansätzen jedoch nur die Parasiten zu bekämpfen und die in den Wirtszellen ebenfalls stattfindende GPI-Biosynthese nicht zu beeinflussen, sind detaillierte Kenntnisse über diesen Stoffwechselweg nötig.

Es wurde ein System aus permeabilisierten Tachyzoiten von *T. gondii* entwickelt und erstmals die Verteilung von GPI-Ankervorläufern und weiterer GPI-Biosyntheseintermediate über die Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) untersucht. Durch hypotone Behandlung wird die Zellmembran effektiv permeabilisiert, das ER bleibt bei dieser Behandlung intakt. Dieses System wurde genutzt, um GPIs mit verschiedenen radioaktiven Vorläufermolekülen (Zuckernukleotiden) zu markieren. Die von permeabilisierten Toxoplasmen gebildeten GPI-Intermediate wurden anhand spezifischer enzymatischer Behandlungen und chemischer Hydrolysen charakterisiert und mit bereits bekannten Daten verglichen. Dabei wurde festgestellt, daß die hydrophilen Komponenten der GPI-Intermediate mit den beschriebenen Strukturen übereinstimmen. Außerdem konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß vor Einsetzen der Mannosylierungs-Schritte eine Acylierung am Inositol von GlcN-PI zu GlcN-(acyl)-PI erfolgt.

Anschließend an die radioaktive Markierung der Glycolipide wurde mit Hilfe des Enzyms PI-PLC, das zwischen hydrophilem und hydrophobem Anteil der GPIs spaltet, die Orientierung der GPI-Biosyntheseintermediate in der ER-Membran untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl frühe, als auch höher glycosylierte Intermediate und sogar GPI-Ankervorläufer zum überwiegenden Teil eine cytoplasmatische Orientierung in der ER-Membran aufweisen. Im Zusammenhang mit transientser Acylierung des Inositolringes scheint ein mehrfacher Wechsel der verschiedenen Intermediate über die ER-Membran ("flip-flop") möglich. Erstmals konnte hier gezeigt werden, daß derart große GPI-Ankervorläufer mit einer zusätzlichen hydrophilen Seitenkette, bestehend aus *N*-Acetyl-Galactosamin α 1-4Glucose, eine Lipid-Doppelmembran überqueren.

2 Einleitung

2.1 *Toxoplasma gondii* – eine Einführung

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulär lebendes, parasitisches Protozoon. Es gehört dem Stamm der *Apicomplexa* an und ist mit Plasmodien, den Erregern der Malaria, verwandt. *T. gondii* ist in der Lage, die meisten warmblütigen Wirbeltiere zu infizieren und führt so zu Krankheiten in Menschen und Nutztieren. Im Normalfall verläuft eine Infektion mit milden, meist unbeachteten Symptomen. Eine größere Rolle spielen Neuinfektionen bei schwangeren Frauen und trächtigen Nutztieren. Hier kann es zu kongenitalen Krankheiten beim Menschen und Aborten in der Nutztierzucht kommen. Da es im Verlauf der Toxoplasmose zur Encystierung und lebenslangen Persistenz der Parasiten im Wirt kommt, ist *T. gondii* auch ein wichtiger opportunistischer Krankheitserreger. In immunsupprimierten Wirten kann es zur Reaktivierung der chronischen Stadien (Bradyzoiten) kommen und zu schweren Krankheitsbildern mit letalem Ausgang führen – ein wichtiger Aspekt bei Transplantations-, Krebstherapie- und vor allem bei AIDS-Patienten.

Mit dem breiten Wirtsspektrum, der hohen Infektionsrate (17-50% aller Menschen, je nach Region) und der im Normalfall symptomlosen Koexistenz mit dem Wirt kann *T. gondii* als einer der erfolgreichsten Parasiten der Welt angesehen werden.

2.2 Systematik

Es handelt sich bei dem Stamm der *Apicomplexa* um eine artenreiche Gruppe einzelliger, meist obligat intrazellulärer Parasiten, dem Krankheitserreger des Menschen (*Toxoplasma*, *Plasmodium*) und tierpathogene Vertreter (*Eimeria*, *Sarcocystis*, *Babesia* und *Theileria*) angehören. Die systematische Zusammenfassung ist auf eine morphologische Gemeinsamkeit der Zellorganisation der infektiösen Stadien aller Arten dieses Stammes zurückzuführen: dem Apikalkomplex. Er besteht aus Conoid, Polringen, präconoidalen Ringen und drei unterschiedlichen Organellen: den Rhoptrien, den dichten Granula ("dense bodies" oder "dense granules") und den Mikronemata. Alle drei Organelltypen sind sekretorisch aktiv. Apicomplexe Parasiten haben einen typischen, dreiphasigen Entwicklungsgang mit Generationswechsel und können dabei je nach Art in einem oder, infolge eines Wirtswechsels, in mehreren Wirten parasitieren. Innerhalb des Stammes der *Apicomplexa* wird *Toxoplasma* der Klasse Sporozoea und der Ordnung der Eucoccida zugeordnet. Die unten aufgeführte Aufstellung der systematischen Einordnung von *Toxoplasma* (nach Mehlhorn und Piekarski, 1998) stellt einen Auszug dar und ist teilweise noch umstritten. So werden teilweise die *Apicomplexa* zusammen mit Ciliaten und Dinoflagellaten in eine neue Gruppe Alveolata eingeordnet.

Protozoa (Einzeller)

Stamm: Apicomplexa (Sporozoa)

Klasse: Sporozoea

Unterklasse: Coccidia

Ordnung: Eucoccidia

1. Unterordnung: Eimeriina

Gattung: *Toxoplasma*

2. Unterordnung: Haemosporina

Gattung: *Plasmodium*

2.3 Morphologie

Bei den Protozoa handelt es sich um meist parasitär lebende Einzeller. Die Zelle wird von einer Zellmembran begrenzt, in ihrem Inneren befinden sich zahlreiche Zellorganellen (Abb. 1), die jedoch in einzelnen Protozoengruppen unterschiedlich ausgeprägt sein können. Bei den beweglichen Stadien der Coccidien treten eine Reihe gemeinsamer Merkmale auf, die in keiner weiteren Gruppe zu finden sind. Die Zellbegrenzung besteht aus einer dreischichtigen Pellicula: Die äußere Membran, das eigentliche Plasmalemma, umschließt die gesamte Zelle, während die beiden inneren dem Plasmalemma untergelagerte Zisternen darstellen. Diese Zisternen werden als Derivate des endoplasmatischen Reticulums (ER) beschrieben (Dubremetz und Torpier, 1978; de Melo und de Souza, 1997). Sie sind sowohl am Apex und am Ende der Zelle unterbrochen und durch Polringe verstärkt, als auch durch eine seitliche Mikropore, durch die eine Partikelaufnahme mittels Endocytose stattfinden kann (Nichols *et al.*, 1994). Die Pellicula wird durch eine Reihe von Mikrotubuli verstärkt, die am vorderen Polring verankert sind und die Zelle zu etwa $\frac{2}{3}$ ihrer Länge durchziehen. Namensgebend für den Stamm der *Apicomplexa* ist eine Ansammlung von speziellen morphologischen Elementen und Organellen am apikalen Pol der motilen Stadien. Dies sind zum einen das Conoid mit weiteren, zum Cytoskelett gehörigen Elementen, und zum anderen mehrere elektronendichte Kompartimente, die große Bedeutung bei der Erkennung und Invasion der Wirtszellen haben (für einen Überblick siehe Dubremetz, 1998; Lingelbach und Joiner, 1998; Carruthers, 2002): Mikronemata, die zur Wirtszellerkennung, Bindung an die Wirtszelle und Bewegung wichtig sind, Rhoptrien, die an der Bildung der parasitophoren Vakuole beteiligt sind, und die dichten Granula, deren Inhalt nach Etablierung der parasitophoren Vakuole ausgeschüttet wird. Das Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle ist ein aktiver Prozeß und erfolgt innerhalb von 5-10 s (Dubremetz *et al.*, 1998) im Gegensatz zur Phagocytose, die ca. zwei Minuten benötigt.

Apicomplexa enthalten außerdem eine intrazelluläre Struktur pflanzlichen Ursprungs, den sogenannten "Apicoplasten" (für eine Übersicht siehe Maréchal und Cesbron-Delauw, 2001). Der Apicoplast stellt ein Plastid dar, *Apicomplexa* haben somit

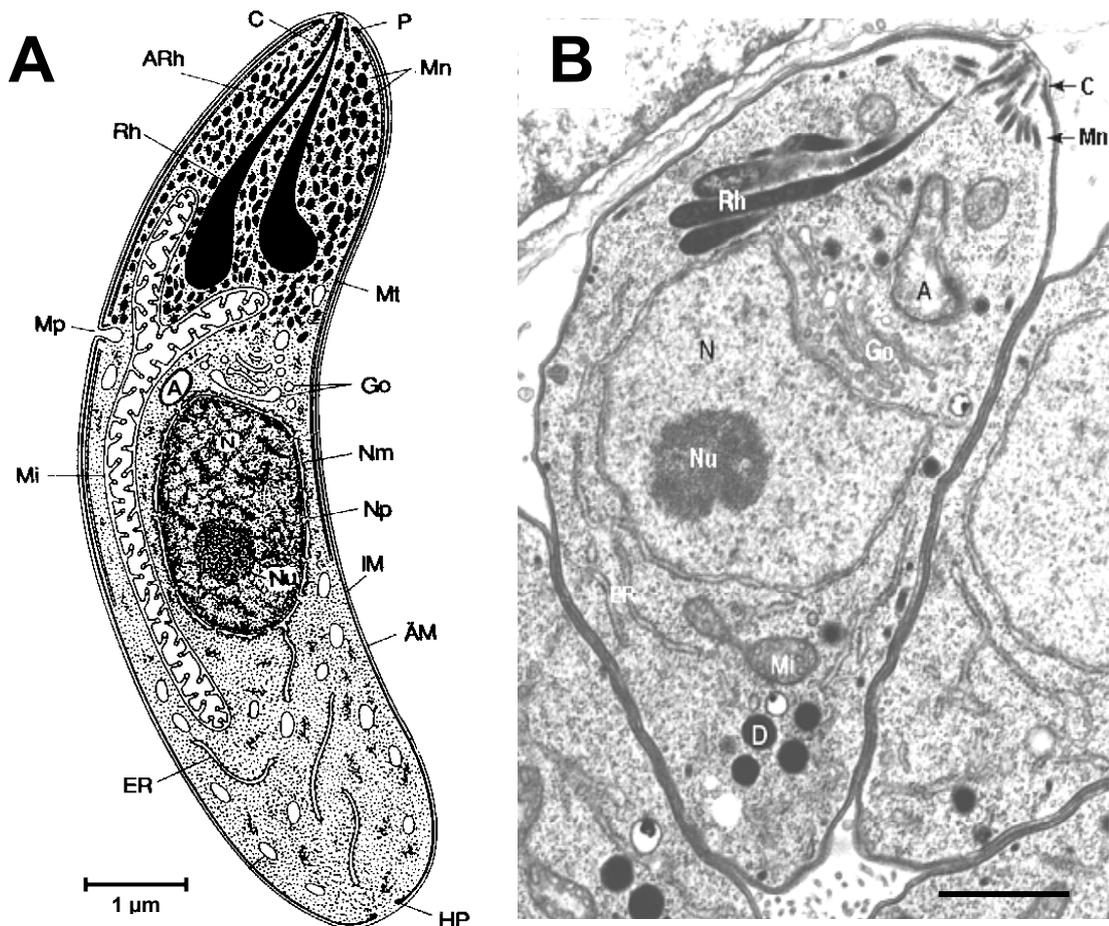


Abb. 1: Schematische Darstellung und EM-Aufnahme von *T. gondii*

A: Schematische Darstellung einer typischen Coccidienzelle (nach Scholtyseck und Mehlhorn, 1973), **B:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Tachyzoiten von *T. gondii* (Dubremetz, 1998). Die akuten, sich schnell teilenden Stadien (Tachyzoiten) der Toxoplasmen gleichen morphologisch weitgehend den stoffwechselträgen, sich langsam teilenden Stadien (Bradyzoiten). A = Apicoplast, ÄM = äußere Membran, C = Conoid, D = dichte Granula, ER = endoplasmatisches Reticulum, Go = Golgi-Apparat, HP = hinterer Polring, IM = innere Membran, Mi = Mitochondrium, Mn = Mikronemata, Mp = Mikropore, Mt = subpelliculäre Mikrotubuli, Nm = Kernmembran, Np = Kernpore, N = Nucleus, Nu = Nucleolus, P = vorderer Polring, Rh = Rhoptries; Größenbalken jeweils 1 µm.

zwei nicht kern-lokalisierte Genome: das mitochondriale Genom und eine vom Plastid stammende zirkuläre DNA von 35 Kb. Der größte Unterschied zwischen dem Genom des Apicoplasten und den Genomen der Plastide höherer Pflanzen oder Algen ist die vollständige Abwesenheit von Genen der Photosynthese. Apicoplasten sind von insgesamt vier Membranen umgeben, was auf eine eukaryontische Alge nach einer zweiten Endosymbiose als Vorläufer hinweist (McFadden *et al.*, 1996; Köhler *et al.*, 1997). Jüngste Arbeiten haben gezeigt, daß die Parasiten *T. gondii* und *Plasmodium falciparum* in der Lage sind, das in Chloroplasten vorkommende Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) zu

synthetisieren (Maréchal *et al.*, 2002). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß Epitope von Proteinen des Apicoplasten mit denen von Chloroplasten-Proteinen aus Landpflanzen verwandt sind (Maréchal *et al.*, 2003). Der Apicoplast ist in der Lage sowohl Fettsäuren (Waller *et al.*, 1998) als auch Vorläufermoleküle für Isoprenoide zu synthetisieren (Jooma *et al.*, 1999). In *P. falciparum* kann die Fettsäure-Biosynthese durch Triclosan (McLeod *et al.*, 2001, Surolia und Surolia, 2001) oder Thiolactomycin (Waller *et al.*, 1998, 2003) inhibiert werden. Die Biosynthese von Isoprenoid kann durch Fosmidomycin inhibiert werden (Jooma *et al.*, 1999). Diese Behandlungen führen zum Absterben der Parasiten, wodurch gezeigt wird, daß der Apicoplast essentiell für das Überleben von apicomplexen Parasiten ist.

2.4 Entwicklungszyklus und Übertragungswege

T. gondii durchläuft wie alle Sporozoen einen Generationswechsel. Dieser weist, typisch für die Coccidien, drei Phasen auf (**nachfolgend aufgeführte Nummern entsprechen der Numerierung in Abb. 2**): Auf eine ungeschlechtliche und meist zu hoher Parasitämie führende multiple Vermehrungsphase (Schizogonie) folgt die geschlechtliche Gamogonie und daran anschließend die Sporogonie (Abb. 2; **1, 2**). Des weiteren weist *T. gondii* einen Wirtswechsel auf. Endwirte für *T. gondii* sind ausschließlich Felidae, in unseren Breitengraden hauptsächlich die Hauskatze, in denen alle drei oben geschilderten Entwicklungsphasen ablaufen können. Als Zwischenwirt kann, wie alle Säugetiere und einige Vögel, auch der Mensch dienen (**3-11**).

Die geschlechtliche Vermehrung findet ausschließlich in Katzen statt. Diese infizieren sich durch Oocysten (**2**), "Pseudocysten" und Gewebecysten (**6, 11**). Hierbei werden die Sporozoiten bzw. Schizonten durch die Verdauungsenzyme von ihrer Cystenhülle befreit, und die freigewordenen Stadien befallen die Zellen der Dünndarm-Mukosa. Es erfolgt eine ungeschlechtliche multiple Vermehrung, die Schizogonie. Die Merozoiten werden durch Schizogonie gebildet. Diese können entweder eine neue Schizogonie einleiten oder sich zu Gamonten umwandeln, welche sich im Verlauf der Gamogonie zu Makro- und Mikrogameten differenzieren. Der Mikrogamont macht die für Coccidien typische Teilung durch und bildet kleine bewegliche Mikrogameten. Nachdem Mikro- und Makrogamet zur Zygote verschmolzen sind, bildet diese eine Wand aus und wird als Oozyste (**1**) ausgeschieden. Hieran schließt sich eine weitere ungeschlechtliche Vermehrung an, die Sporogonie (**2**). Im Freien entwickeln sich innerhalb der Cyste in wenigen Tagen die für den nächsten Wirt infektiösen Sporozoiten. Geschützt durch die Cystenwand können diese bis zu einem Jahr und länger überleben (Hutchinson, 1965; Hutchinson *et al.*, 1970; Frenkel *et al.*, 1970).

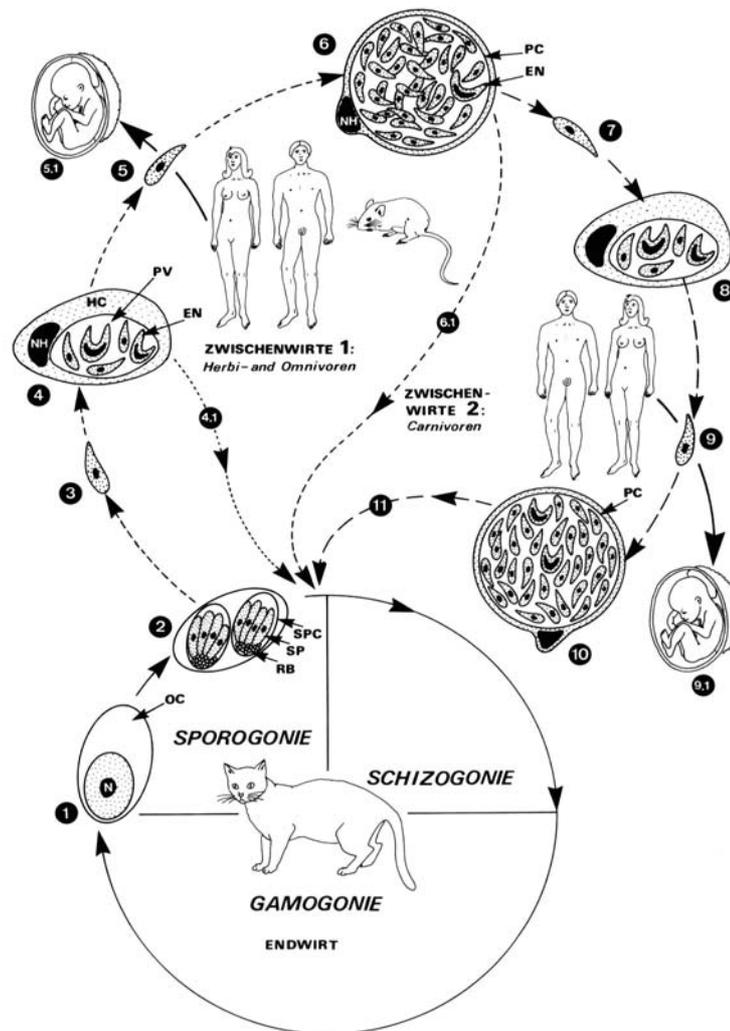


Abb. 2: Entwicklungszyklus und Übertragungswege von *Toxoplasma gondii*

Nur im Endwirt (Felidea) läuft der für Coccidien typische dreiphasige Zyklus mit geschlechtlicher Vermehrung ab: Schizogonie, Gamogonie und Sporogonie (1, 2). Zwischenwirte (Warmblüter, z. B. Mensch) infizieren sich entweder durch Aufnahme von Oocysten aus Katzenkot (2-6) oder durch Pseudo- bzw. Gewebecysten im Fleisch eines infizierten Zwischenwirtes 1 (6-10). Zusätzlich kann im Zwischenwirt bei einer Erstinfektion eine diaplazentare Infektion des Fötus stattfinden (5.1, 9.1). EN = Endodyogenie, HC = Wirtszelle, NH = Nucleus der Wirtszelle, OC = Oocyste, PC = Primäre Cystenwand, PV = Parasitophore Vakuole, RB = Restkörper, SP = Sporozoit, SPC = Sporocyste; (nach Mehlhorn und Piekarski, 1998).

Ein Zwischenwirt kann sich nun ebenfalls durch orale Aufnahme von Oocysten infizieren (2). Es erfolgt eine starke ungeschlechtliche Vermehrung durch Endodyogenie (4 und 6 bzw. 8 und 10). Hierbei entstehen in der Nähe des Zellkerns Anlagen von zwei neuen Apikalkomplexen, und ohne daß es zu einer Chromosomenkondensierung kommt, teilt sich der Zellkern (4). Die Tochtertoxoplasmen werden größer, bis schließlich die Mutterzelle verschwindet. Für ihre eigene Oberfläche verwenden die Tochterzellen dabei die äußere Membran der Mutterzelle. Eine Teilung findet alle 5-9 Stunden statt. Die Teilung findet bis zu einer

Anzahl von ca. 256 Parasiten statt, so daß die Wirtszelle völlig mit Parasiten gefüllt ist (Pseudocyste). Anschließend platzt die Zelle, die Tachyzoiten werden freigesetzt und dringen in benachbarte Zellen ein (5). Im Gegensatz zu diesen sogenannten Pseudocysten bildet *T. gondii* nach einiger Zeit auch echte Gewebecysten (6, 10). Diese von einer festen und widerstandsfähigen Cystenwand umgebenen Toxoplasmaformen werden aufgrund ihrer langsamen Vermehrung Bradyzoiten genannt. Diese Dauerform des Parasiten kommt bevorzugt im Gehirn, in der Muskulatur, speziell dem Herzmuskel, aber auch in der Retina und in anderen Geweben vor. Diese Wartestadien können durch den Genuß von rohem, infiziertem Fleisch einen weiteren Zwischenwirt befallen und dort ebenfalls über Endodyogenie und Cystenbildung zum Befall führen (7-10). Werden sie jedoch von der Katze als Endwirt aufgenommen (6.1), initiieren sie über die Entwicklung zu Schizonten den intrafelidaen Zyklus erneut.

Bei einer Erstinfektion kann in vielen Zwischenwirten außerdem noch eine diaplazentare Übertragung auf den Fötus erfolgen (5.1, 9.1).

2.5 Toxoplasmose

Toxoplasmose ist eine der häufigsten parasitären Zoonosen weltweit. Der Erreger dieser Erkrankung kann, soweit bekannt, jede kernhaltige Zelle höherer Wirbeltiere infizieren. Von der adulten menschlichen Bevölkerung sind 15-85% infiziert, hierbei steigt eine Prävalenz proportional zum Lebensalter an. Der Mensch kann sich auf mehreren Wegen mit Toxoplasmen infizieren:

1) über Oocysten in Katzenkot

Oocysten, die aus der sexuellen Vermehrung der Toxoplasmen im Katzendarm hervorgehen, werden mit dem Kot ausgeschieden. Nach 3-5 Tagen im Freien sind sie sporuliert, d. h. sie enthalten 2 Sporocysten mit je 4 Sporozoiten. Diese für den Menschen infektiösen Stadien sind sehr widerstandsfähig.

2) über rohes oder unzureichend gegartes Fleisch

Gewebecysten von *Toxoplasma* werden beim Verzehr von rohem Schweine-, Rind- oder Schaffleisch aufgenommen. In Deutschland stellt für den Menschen infiziertes Schweinefleisch die größte Infektionsquelle dar.

3) durch konnatale Infektion

Die Erstinfektion einer Schwangeren führt unbehandelt in ca. 50% der Fälle zu einer Toxoplasmose des Kindes, wobei die Transmissionsrate vom ersten bis zum dritten Trimenon deutlich zunimmt (von 25% auf 65%, Desmonts und Couvreur, 1974). Gleichzeitig nimmt jedoch das Risiko sehr schwerer Schädigungen des Fötus mit dem Verlauf der Schwangerschaft ab. Eine Infektion im ersten Trimenon der Schwangerschaft führt meist zur Todgeburt, Frühgeburt oder Geburt eines schwerkranken Kindes. Infektionen im zweiten Trimenon können zu einem Hirnbefall

mit Hydrozephalus, intracerebralen Verkalkungen oder Chorioretinitis führen. Findet die Infektion erst im letzten Trimenon statt, weisen die Kinder oft eine generalisierte Infektion auf oder sind asymptomatisch. Jedoch droht 80-90% von ihnen eine Chorioretinitis mit möglicher Erblindung bis zum 20. Lebensjahr.

4) durch Transplantate, die Gewebecysten enthalten

Transplantate, die Gewebecysten von *Toxoplasma* enthalten (vor allem Knochenmark), bergen für immunsupprimierte Empfänger die Gefahr einer akuten Toxoplasmose. Auch die Verabreichung von Vollblutpräparaten kann zur Infektion führen.

Im Normalfall verläuft eine Toxoplasmainfektion des Menschen asymptomatisch oder mit milden Symptomen wie Fieber, Kopfschmerz, Frieren, Muskelschmerz, Lymphdrüsenentzündung oder starker Müdigkeit. Selten äußert sie sich mit einer Lymphadenitis oder Enzephalitis.

Neben der Gefahr einer konnatalen Infektion bei erstinfizierten Schwangeren spielt *T. gondii* bei einer weiteren Personengruppe eine wichtige medizinische Rolle. Bei latent infizierten Personen kann es aufgrund einer Immunsuppression zu einer Reaktivierung der Gewebescysten mit nachfolgender cerebraler oder disseminierter Toxoplasmose kommen. Hierzu bedarf es selektiver Immunerkrankungen des lymphozytären T-Zellsystems, speziell Unter- oder Fehlfunktionen der T-Helferzellen. Dieser Zustand wird auch durch Behandlungen zur Verhinderung von Transplantatabstoßungen, bei malignen Leiden des lymphopoetischen Systems und bei bestimmten Autoaggressionskrankheiten hervorgerufen. Ausschlaggebend für die Reaktivierung einer Toxoplasmose dürfte hierbei der Mangel an T-Zellprodukten wie z. B. Gamma-Interferon und Interleukin-2 sein (Vollmer *et al.*, 1987).

Bei AIDS-Patienten stellt die cerebrale Toxoplasmose die häufigste opportunistische Infektion des zentralen Nervensystems dar. Nach der Ruptur von Cysten im Gehirn können die freigesetzten Toxoplasmen ungehemmt Zellen der näheren Umgebung befallen und durch deren Zerstörung zentrifugal auswachsende Nekroseareale schaffen. Eine ebenfalls schwerwiegende und zum Tode führende Manifestation kann der Befall der Lungen sein. Auch hier kommt es zu Nekroseherden. Ein an sich zu erwartender perakuter Verlauf mit generalisierter organzerstörender Toxoplasmose kommt bei AIDS-Patienten nicht vor, obwohl sich wesentlich mehr Toxoplasmacysten außerhalb des Gehirns befinden als innerhalb (Adair *et al.*, 1989). In Deutschland haben ca. 40% der AIDS-Patienten mit einer cerebraltoxoplasmotischen Manifestation zu rechnen. Jedoch weisen nur 30-50% der AIDS-Patienten, die chronisch mit *T. gondii* infiziert sind, eine Toxoplasmaencephalitis auf, so wie auch nur die Hälfte der Infektionen während der Schwangerschaft zu einer congenitalen Schädigung des Neugeborenen führen. Dies weist auf eine unterschiedliche Virulenz verschiedener Toxoplasma-Stämme hin.

Aufgrund der hohen Durchseuchungsrate der Weltbevölkerung mit Toxoplasma und einer hohen Anzahl mit dem AIDS-Virus infizierter Menschen muß vor allem in Asien und Afrika damit gerechnet werden, daß in den nächsten Jahren und Jahrzehnten Hunderttausende bis Millionen von Menschen an Cerebralttoxoplasmose erkranken und sterben könnten.

2.6 Glycosylphosphatidylinositole

Lange Zeit war das Prinzip der Verankerung von Proteinen in Plasmamembranen durch eine (z. B. Glycophorin A) oder mehrere (z. B. Bakteriorhodopsin) hydrophobe Transmembrandomänen die einzig bekannte Möglichkeit. Mitte der siebziger Jahre gab es aber Hinweise darauf, daß für die stabile Membranverankerung von Proteinen auch andere Strukturen in Frage kommen. Durch Behandlung mit einem bakteriellen Enzym, der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC), konnten bestimmte Membranproteine von der Zelloberfläche abgelöst werden (Low und Finean, 1977; Low, 1990). Es wurde daraufhin ein Membrananker auf der Basis eines Phosphatidylinositols postuliert. Untersuchungen am Hauptoberflächenprotein VSG ("variant surface glycoprotein") von *Trypanosoma brucei brucei* ergaben weiterhin, daß der Carboxyterminus des Proteins über eine Peptidbindung an ein Ethanolamin und ein Kohlenhydrat gebunden ist (Holder und Cross, 1981; Holder, 1983). Diese Beobachtungen führten schließlich zu dem Konzept des Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Membranankers (Cardoso de Almeida und Turner, 1983; Ferguson und Cross, 1984; Ferguson *et al.*, 1985; 1988). Die erste vollständige Struktur eines GPI-Ankers wurde für das variable Oberflächen-Glycoprotein ("variant surface glycoprotein", VSG) von *T. b. brucei* beschrieben (Ferguson *et al.*, 1988).

Proteine entstehen durch Translation an den Ribosomen, wobei der genetische Code der m-RNA in eine Aminosäuresequenz umgesetzt wird. Die meisten der gebildeten Proteine werden anschließend cotranslational oder posttranslational modifiziert, damit sie ihre endgültige Struktur und somit ihren Funktionszustand erhalten. Bekannt sind Modifikationen durch Fettsäuren, Phosphat, Isoprenoide, Glycane oder Kombinationen dieser Substituenten. Häufig sind diese Modifikationen für die Funktion der Proteine und/oder ihren Transport in der Zelle von entscheidender Bedeutung (für eine Übersicht siehe "Lipid Modifications of Proteins", Eds. Milton und Schlesinger, 1993; Clayton *et al.*, 1995; Baumann und Menon, 2002).

Beispiele für Glycanmodifikationen von Proteinen sind *N*-Glycosylierung und *O*-Glycosylierung. Es handelt sich dabei um die Übertragung von Oligosaccharidketten, die auf bestimmte Aminosäuren übertragen werden können. *N*-Glycane werden über das Stickstoffatom der Seitenkette der Aminosäure Asparagin gebunden. Dabei muß sich Asparagin innerhalb einer bestimmten Aminosäuresequenz (Asp-X-Ser/Thr) befinden. Das Hauptoberflächenprotein SAG1 (surface antigen1) von *T. gondii* besitzt eine

potentielle Anknüpfungsstelle für *N*-Glycane, die jedoch nicht genutzt wird (Zinecker *et al.*, 2001). *O*-Glycane sind Oligosaccharidketten, die über eine Hydroxylgruppe der Aminosäuren Serin oder Threonin an das Protein gebunden werden. Bei *T. gondii* wurden *O*-Glycane auf dem Protein GRA2 nachgewiesen (Zinecker *et al.*, 1998). Die Bindung an Glycosylphosphatidylinositole (GPIs) stellt eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation von Proteinen durch Glycane dar (Ferguson *et al.*, 1985; Ferguson 1999). GPIs bilden eine Klasse von Glycolipiden, die bei allen Eukaryonten vorkommt. Sie kommen sowohl in freier als auch in proteingebundener Form vor (Kinoshita *et al.*, 1997). Als freie GPIs stellen sie Stoffwechselprodukte dar und erfüllen zahlreiche Funktionen (siehe Abschnitt 2.7; Kinoshita und Inoue, 2000). Sind GPIs an Proteine gebunden, verankern sie diese in der Zellmembran (Ferguson, 1999). Vor allem für Protozoen stellt die Proteinverankerung über GPIs die wichtigste Form dar. So sind zahlreiche Hauptoberflächenproteine mit GPIs in der Membran verankert (VSG bei *T. brucei*; MSP bei *P. falciparum*; SAG1 bei *T. gondii*)

2.7 Funktion und Bedeutung der GPIs

Die primäre Funktion von GPIs ist die Verankerung von Proteinen auf der Außenseite eukaryontischer Plasmamembranen (Schenkman *et al.*, 1988). Die Anheftung des GPI-Ankers stellt dabei eine alternative Möglichkeit zur stabilen Protein-Verankerung in Membranen dar (McConville und Ferguson, 1993). Es sind zahlreiche Proteine bei den verschiedensten eukaryontischen Organismen bekannt, die durch GPI in der Zellmembran verankert sind. Dabei gibt es wichtige Unterschiede zu der direkten Verankerungsmöglichkeit durch hydrophobe Proteinanteile (Field und Menon, 1992).

GPI-verankerte Proteine sind bei einer Vielzahl von Prozessen beteiligt: Zum Beispiel das neutrale Zelladhäsions-Molekül NCAM-1 bei der Zelladhäsion (Powell *et al.*, 1991), der decay accelerating factor (DAF) bei enzymatischer Katalyse oder die 5'-Nukleotidase in der Zellmembran (Caras und Weddel, 1988; Stochaj *et al.*, 1989). Weiterhin weisen Untersuchungen darauf hin, daß die GPI-Verankerung von Proteinen eine Rolle beim intrazellulären Transport spielt, z. B. für den gerichteten Transport zur apikalen Membran von Madin Darby Canine Kidney- (MDCK-)Zellen (Lisanti *et al.*, 1990; 1991). In Hefe ist die GPI-Biosynthese und -Verankerung überlebenswichtig für die Zellen (Leidich *et al.*, 1994) und GPIs spielen eine Rolle bei der Synthese und dem Aufbau der Zellwand (Kollar *et al.*, 1997).

Protozoen haben meist einen deutlich höheren Anteil GPI-verankerter Proteine an der Zelloberfläche als höhere Eukaryonten. Die GPI-Verankerung des Hauptoberflächenproteins VSG von *T. b. brucei* bietet beispielsweise dem Parasiten den Vorteil, dessen so verankertes VSG sehr dicht packen zu können (Cross, 1996; Ferguson, 1999). Das dicht gepackte VSG verhindert das Eindringen von

Makromolekülen in diesen Proteinmantel. Da die Makromoleküle des Komplementsystems auf diese Weise von der Zellmembran ferngehalten werden, ist der Parasit vor diesem Abwehrmechanismus seines Wirtes weitgehend geschützt (Ferguson, 2000). Auch die eigentliche Struktur der GPIs unterstützt diese Schutzwallbildung (Homans *et al.*, 1989).

GPI-verankerte Proteine in lipid-reichen Mikrodomänen der Zellmembran (sogenannte "rafts") haben eine besondere Bedeutung bei Signaltransduktions-Prozessen von Proteinkinasen der src-Familie (Stulnig *et al.*, 1998; Kasahara und Sanai, 2000). Botenstoffe können dort lokalisierte Proteinkinasen aktivieren, durch deren Produkte weitere Schritte einer Signalkaskade aktiviert werden (Tachado *et al.*, 1997). Auf diese Weise kann durch ein Signal an der Zellmembran der Aktivierungszustand einer Zelle beeinflusst werden (Tachado *et al.*, 1999). Durch Untersuchungen an Lymphozytenantigenen (z. B. CD 59, Thy-1 und CD 55 (DAF)) konnte gezeigt werden, daß identische Oberflächenantigene je nachdem, ob sie durch GPI oder durch eine transmembrane Proteinkomponente verankert sind, unterschiedlich reagieren. So konnten bemerkenswerterweise nur die GPI-verankerten Antigene nach Bindung mit Antikörpern eine Signaltransduktion auslösen (Schofield *et al.*, 1994; Tachado *et al.*, 1999). Darüber hinaus wird diskutiert, ob GPIs auch direkt als "second messenger" auf die Signalgebung der Zelle Einfluß nehmen können. Es ist denkbar, daß verschiedene GPIs (freie und/oder proteingebundene GPIs) unterschiedliche Funktionen in Zellen wahrnehmen (Gaulton und Pratt, 1994). Sowohl Kohlenhydrat- als auch Lipidanteil der GPIs können für die Aktivierung verschiedener Signalwege verantwortlich sein. Untersuchungen an Makrophagen zeigen, daß die Zuckerkomponenten verschiedener parasitärer GPIs ausreichen, um Protein-Tyrosin-Kinasen zu aktivieren (Tachado *et al.*, 1997). Zusätzlich können GPI-Diacylglycerole eine Calcium-unabhängige Form der Proteinkinase C aktivieren (Tachado *et al.*, 1997). Diese beiden Signalkaskaden sind beteiligt an der Regulation der Genexpression von Interleukin-1, TNF- α und der NO-Synthetase (Tachado *et al.*, 1996; 1997; Almeida *et al.*, 2000; Debierre-Grockiego *et al.*, 2003). Dies hat vor allem für das Verständnis der Pathophysiologie der Malariaerkrankung und der Toxoplasmose Bedeutung. Aus *P. falciparum* freigesetzte GPIs können einerseits über diesen Mechanismus zu extrem hohen TNF- α -Spiegeln führen und die Ausschüttung von IL-1 und NO als weitere wichtige Entzündungsmediatoren mitbeeinflussen. Darüber hinaus sind GPIs auch an der Expressionsregulation von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen (ICAM-1, VACM-1, E-Selectin) beteiligt (Vijaykumar *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002), die eine wichtige Rolle beim Krankheitsbild der cerebralen Malaria spielen (Ho und White, 1999). Ein weiterer pathophysiologisch interessanter Aspekt ist die insulinmimetische Wirkung der GPIs. Anfang der neunziger Jahre sah Saltiel GPIs als mögliche "second messenger" der Signaltransduktion der Insulinantwort an (Saltiel, 1991; 1996). Da auch im Verlauf

einer Malariaerkrankung gefährliche Hypoglykämien auftreten können, wurden GPIs auch hier zum Gegenstand der pathophysiologischen Forschung. Es zeigte sich, daß GPIs von *P. falciparum* in Adipocyten Glucoseoxidation und Lipogenese auslösen können. Auch im Tierversuch konnte nach Applikation von GPIs aus *P. falciparum* ein Abfall der Blutglucose registriert werden (Schofield und Hackett, 1993; Schofield *et al.*, 1993).

2.8 Struktur und Vorkommen der GPIs

GPIs wurden zunächst bei dem Protozoon *T. b. brucei* entdeckt und charakterisiert (Ferguson *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 1988). Später folgten dann Charakterisierungen bei zahlreichen anderen eukaryontischen Organismen (für eine Übersicht siehe McConville und Ferguson, 1993; Gerold *et al.*, 1996b, Eckert *et al.*, 1996; Ferguson, 1999). Mittlerweile ist eine Vielzahl von Proteinen bei den verschiedensten Eukaryonten bekannt, die über einen GPI-Membrananker verfügen (McConville und Ferguson, 1993, Englund, 1993). Beispiele dafür sind bei höheren Lebewesen die alkalische Phosphatase in Hepatocyten (Kihn *et al.*, 1990) oder die Acetylcholinesterase aus Erythrozyten (Hooper, 1997) sowie Prion-Proteine, welche die Erreger der Bovinen Spongiformen Encephalopathie (BSE), Scrapie und Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) darstellen (Prusiner, 1996). Daneben wurden auch zahlreiche freie und proteingebundene GPIs hinsichtlich ihrer Struktur untersucht. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß es eine in den verschiedenen Organismen gleiche Grundstruktur der GPIs gibt (graphische Darstellung der Grundstruktur s. Abb. 3; Field und Menon, 1992; McConville und Ferguson, 1993), die durch Anheftung einer Vielzahl von Substituenten variiert wird (McConville und Ferguson, 1993; Gerold *et al.*, 1996b; Eckert *et al.*, 1996; Ferguson, 1999).

GPIs bestehen aus einem Ethanolaminphosphat, das mit der C-terminalen Aminosäure des Proteins eine Peptidbindung eingeht. Über eine Phosphodiesterbindung ist das Ethanolamin auf der anderen Seite mit einem Trimannosyl-Glycan verbunden (Ferguson *et al.*, 1994). Der Glycananteil kann stark variieren (Ferguson, 1999). Immer gleich ist jedoch die evolutionär hochkonservierte Glycan-Grundstruktur, bestehend aus drei α -gebundenen Mannosen (Mannose α 1-2Mannose α 1-6Mannose), die an ein nicht-acetyliertes Glucosamin gebunden sind. An das Glucosamin schließt sich das Phosphatidylinositol an, an das der Lipidanteil gebunden ist (McConville und Ferguson, 1993). Der hydrophobe Anteil kann sowohl aus an Glycerol gebundenen Fettsäuren oder langkettigen Alkoholen, als auch aus Ceramiden aufgebaut sein (Übersicht: Englund, 1993, Field und Menon, 1992, Ferguson, 1999). Eine häufige Modifikation ist die Acylierung des Inositols an der C2-Position (Treumann *et al.*, 1995), die eine Spaltung des GPI-Moleküls durch PI-PLC verhindert (McConville und Ferguson, 1993).

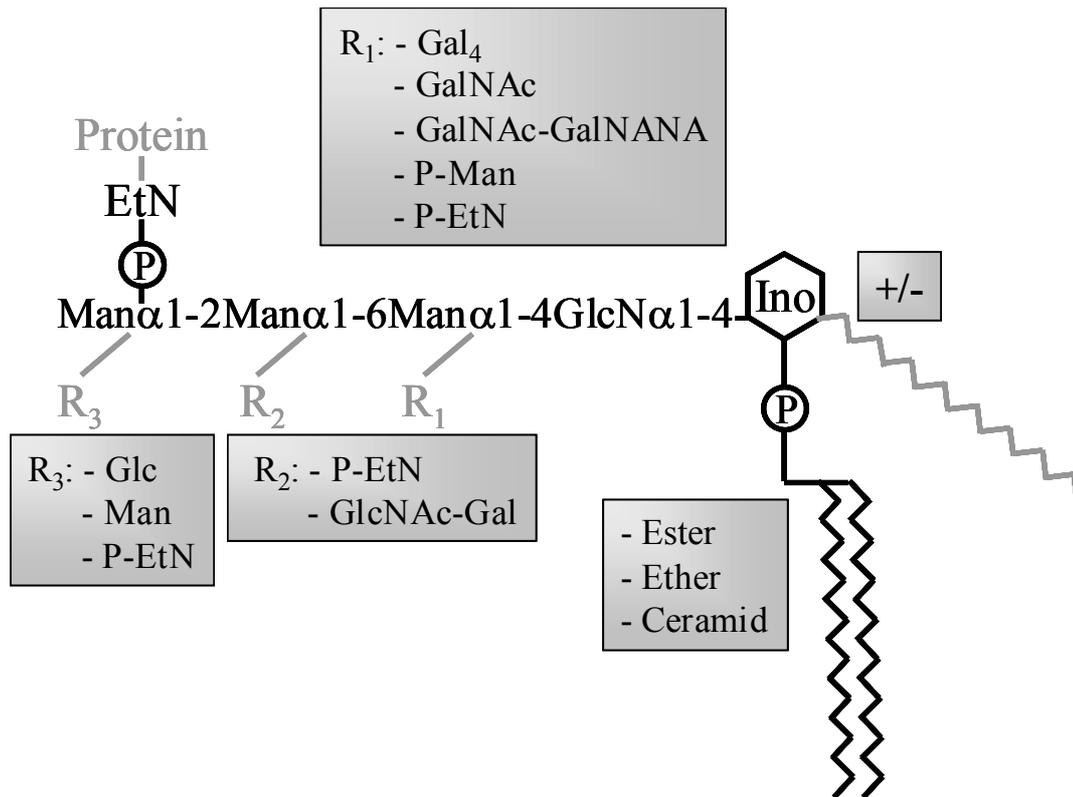


Abb. 3: Schematische Darstellung der konservierten Grundstruktur und Variationsmöglichkeiten von GPI-Membranankern

Schwarz dargestellt ist die konservierte Grundstruktur von GPI-Ankern. Sie besteht aus einem Ethanolaminphosphat (EtN-P), an das der C-Terminus von Proteinen geknüpft wird, dem Trimannosyl-Core-Glycan, nicht-acetyliertem Glucosamin (GlcN), Inositol (Ino) und einem Phospholipid. Der Lipidteil kann aus Fettsäuren, langkettigen Alkoholen oder Ceramiden bestehen, zusätzlich kann das Inositol acyliert sein. Grau dargestellt sind Seitengruppen, durch die GPIs modifiziert sein können. Die grau unterlegten Boxen zeigen einige Beispiele für beschriebene Variationen der Grundstruktur. Man = Mannose, Glc = Glucose, Gal = Galactose, GlcNAc = *N*-Acetyl-Glucosamin, GalNAc = *N*-Acetyl-Galactosamin, NANA = *N*-Acetylneuraminsäure.

2.9 GPIs und das "Low Molecular Weight Antigen" von *T. gondii*

Die Hauptoberflächenproteine P30 (SAG1), P43 (SAG3), P22 (SAG2), P35 und P23 (SAG4) in der Membran von Tachyzoiten sind durch GPIs inseriert (Nagel und Boothroyd, 1989, Tomavo *et al.*, 1989; 1993). Durch umfangreiche Radiomarkierungsexperimente von *T. gondii*-Kulturen und zellfreien Membranpräparationen aus Toxoplasmen konnten die Strukturen der GPI-Anker und deren Vorläufermoleküle charakterisiert werden. Zunächst wurde in *in vitro*-Experimenten ein Strukturvorschlag der Form EtN-Man₃(GalNAc)GlcN-PI erarbeitet (Tomavo *et al.*, 1992c), dem auch die Struktur des Ankers des Oberflächenproteins P23 entsprechen soll (Tomavo *et al.*, 1993). Außerdem wurden am Inositol acylierte, vermutlich transiente Mannosylierungsintermediate beschrieben (Tomavo *et al.*, 1992c; Striepen *et al.*, 1997).

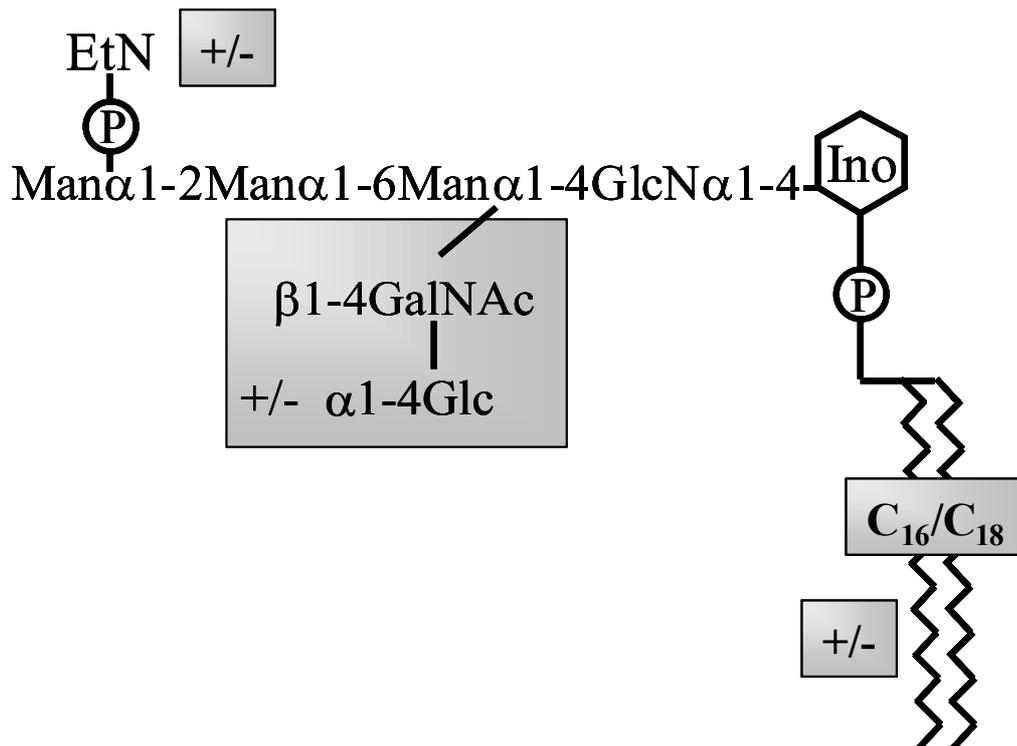


Abb. 4: GPI-Struktur von *T. gondii* (Striepen *et al.*, 1997; Zineker *et al.*, 2001)

Dargestellt ist die Struktur des Glycolipids II von *T. gondii* mit endständigem Ethanolaminphosphat, $\beta 1\text{-}4 \text{GalNAc}\text{-}\alpha 1\text{-}4 \text{Glc}$ -Seitenkette und zwei Fettsäuren. Glycolipid II wird zur Verankerung von Oberflächenproteinen, z. B. SAG1, verwendet oder kommt als freies Glycolipid auf der Parasitenoberfläche vor. Es unterscheidet sich von den anderen *Toxoplasma*-Glycolipiden durch das Vorhandensein von Ethanolaminphosphat und Glucose, sowie in der Fettsäurezusammensetzung (Abkürzungen vgl. Abb. 3).

Weiterführende Untersuchungen der freien GPIs offenbarten eine weitere Modifikation des *N*-Acetyl-Galactosaminrestes durch eine $\alpha 1\text{-}4$ -gebundene Glucose (Abb. 4, Striepen *et al.*, 1997). Es zeigte sich auch, daß es sich bei dieser Struktur um das sogenannte "Low Molecular Weight Antigen" handelt: In den 80er Jahren wurden umfangreiche Western-Blot Analysen mit menschlichen Infektionsseren durchgeführt, um für diagnostische Zwecke Marker für eine akute Infektion zu bestimmen (Sharma *et al.*, 1983, Potasman *et al.*, 1986; Potasman *et al.*, 1987; Rotmanns *et al.*, 1988).

Die Diagnose einer akuten Infektion ist vor allem in der Schwangerenvorsorge von großer Bedeutung. Während Immunglobuline der Klasse G eine Vielzahl von *Toxoplasma*-Molekülen erkennen, bleibt das Spektrum von IgM auf P30, P22 und ein bis dahin unbekanntes Antigen mit niedrigem Molekulargewicht ("Low Molecular Weight Antigen") beschränkt (Sharma *et al.*, 1983). Erste Untersuchungen ergaben Hinweise auf ein Glykokonjugat mit dem Postulat eines Glycopeptids (Sharma *et al.*, 1983). In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, daß das "Low Molecular Weight Antigen" mit organischen Solventien (Chloroform/Methanol/Wasser, 10:10:3)

extrahierbar und in der Dünnschichtchromatographie darstellbar ist (Striepen *et al.*, 1991).

Erste Charakterisierungen legten nahe, daß es sich um hochglycosylierte Glycolipide des Glycosylphosphatidylinositol-Typs handeln könnte (Striepen *et al.*, 1991; Striepen *et al.*, 1992). Dieses wurde dann durch umfangreiche Analysen bestätigt (Striepen *et al.*, 1997). Parallele Untersuchungen an dem Membrananker des Hauptoberflächenproteins P30/SAG1 offenbarten eine Heterogenität des verwendeten Ankertyps. Es konnte gezeigt werden, daß zwei verschiedene Glycosylierungsformen, mit und ohne Glucose, im GPI-Anker von SAG1 vorkommen (Zinecker *et al.*, 2001).

Die Fettsäurezusammensetzung der untersuchten GPIs ist heterogen (Striepen *et al.*, 1997). Die GPI-Anker der Oberflächenproteine P23/SAG4 und P30/SAG1 bestehen jedoch zum überwiegenden Teil aus Dipalmitoylglycerol (Tomavo *et al.*, 1993; Zinecker *et al.*, 2001). Spekuliert wird über ein sogenanntes Fettsäure-"Remodelling", wie es bei *T. b. brucei* stattfindet (Masterson *et al.*, 1990; Buxbaum *et al.*, 1994).

2.10 GPI Biosynthese und Topologie

Der erste Schritt in der GPI-Anker Biosynthese ist die Übertragung von *N*-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) mit UDP-GlcNAc als Donor auf Phosphatidylinositol (PI) zur Bildung von GlcNAc-PI (Abb. 5; Masterson *et al.*, 1989; Menon *et al.*, 1990; Stevens und Raetz, 1991; Costello und Orlean, 1992; Kinoshita *et al.*, 1997). Bereits dieser erste Schritt der GPI-Anker-Biosynthese erfolgt an einem Enzymkomplex aus mindestens sechs assoziierten Proteinen (Watanabe *et al.*, 1998; 2000; Shams-Eldin *et al.*, 2002) - ein Hinweis auf die Komplexität der GPI-Biosynthese. In der zweiten Reaktion erfolgt die de-*N*-Acetylierung (Doering *et al.*, 1989; Kinoshita und Inoue, 2000), wodurch GlcN-PI entsteht. Das dafür verantwortliche Enzym, die GlcNAc-PI de-*N*-Acetylase, ist das bisher einzige Enzym in der GPI-Anker Biosynthese, das teilweise gereinigt und biochemisch charakterisiert werden konnte (Milne *et al.*, 1994; Nakamura 1997). Folgt man dem Grundschemata, werden nun drei Mannosen von Dolicholphosphat-Mannose (Dol-P-Man) als Donor (Menon *et al.*, 1990a) übertragen. Abschließend wird Ethanolaminphosphat von Phosphatidylethanolamin auf die terminale Mannose des Core-Glycans übertragen (Menon *et al.*, 1993).

Wie zu vermuten, gibt es bei den Strukturunterschieden der GPIs verschiedener Organismen auch Abweichungen bei der GPI-Anker-Biosynthese. So wird zum Beispiel bei *P. falciparum* in Analogie zur GPI-Biosynthese in Säugetierzellen (Englund, 1993) eine Fettsäure an das Inositol geknüpft, bevor die Mannosen auf das deacetylierte Glucosamin übertragen werden (Gerold *et al.*, 1994; 1999). Bei *T. brucei* finden Acylierung und Deacylierung des Inositols parallel zu den Mannosylierungsschritten, frühestens aber nach Übertragung der ersten Mannose statt (Güther und Ferguson, 1995; Smith *et al.*, 1999). Diese hydrophobe Modifikation verhindert bei diesen GPIs die

Spaltung durch das Enzym (G)PI-PLC. Auch für *T. gondii* wurden solche PI-PLC-resistente Zwischenprodukte beschrieben (Tomavo *et al.*, 1992c; Striepen *et al.*, 1997). Weiterhin geht in Säugerzellen einer Übertragung der Mannosereste zwei und drei die transiente Anheftung von Ethanolaminphosphat an den ersten Mannoserest voraus (Hong *et al.*, 1999). Bei *T. brucei* wiederum erfolgt nach dem Fertigstellen der GPI-Grundstruktur ein Austausch der Fettsäuren am Glycerol, das sogenannte "fatty acid remodelling" (Masterson *et al.*, 1990; Güther und Ferguson, 1995). Die Substitution der GPI-Grundstruktur erfolgt bei den bisher untersuchten Protozoen des Stammes *Apicomplexa* vor der Übertragung auf das Protein. Bei *P. falciparum* beispielsweise wird terminal ein zusätzlicher Mannoserest in α 1-2-Bindung (Gerold *et al.*, 1994) und bei *P. yoelii yoelii* an dieser vierten Mannose ein weiteres Ethanolaminphosphat (Kimmel *et al.*, 2003) angefügt. Im Gegensatz dazu erfolgt eine Modifikation der GPIs bei Vertretern der Familie *Trypanosomatidae* erst nach Übertragung auf das Protein.

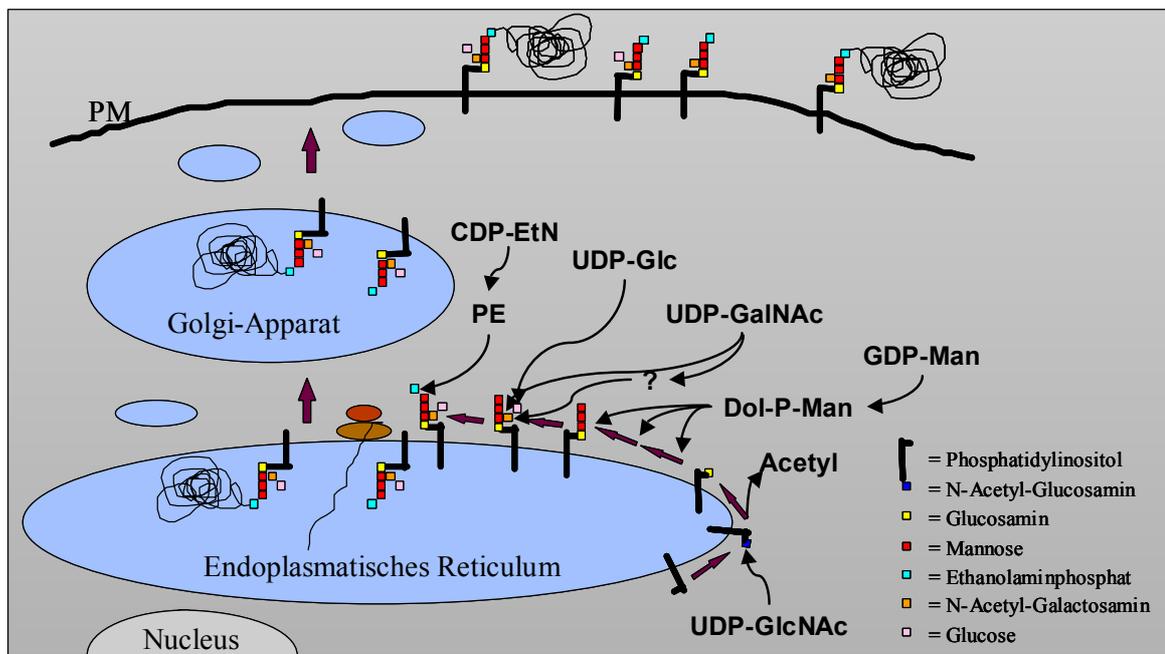


Abb. 5: Schematische Darstellung der GPI-Biosynthese in *T. gondii*

GPI-Anker werden schrittweise am endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert. Die Reaktion startet mit der Übertragung von *N*-Acetyl-Glucosamin auf Phosphatidylinositol und anschließender de-*N*-Acetylierung. Darauf folgend werden drei Mannosen, *N*-Acetyl-Galactosamin, Glucose und abschließend Ethanolaminphosphat übertragen. Die Donoren der einzelnen Komponenten sind, soweit bekannt, angegeben. Lediglich der Donor für die GalNAc-Modifikation ist nicht bekannt. Die Übertragung des fertigen GPI-Ankers auf das Protein erfolgt im Lumen des ER. Die GPI-verankerten Proteine und freie GPIs werden auf dem sekretorischen Weg über den Golgi-Apparat an die Parasitenoberfläche transportiert. PM = Plasmamembran, PE = Phosphatidylethanolamin.

Bei *T. gondii* sind GPIs durch eine Seitenkette bestehend aus β 1-4GalNAc α 1-4Glc an der innersten Mannose modifiziert (Striepen *et al.*, 1997; Zinecker *et al.*, 2001). Ein Teil der auf die Oberfläche gelangenden GPIs (sowohl proteinverankernde als auch freie GPIs) sind allerdings nicht glucosyliert (Striepen *et al.*, 1997, Zineker *et al.*, 2001). Die Übertragung der Glucose erfolgt direkt von UDP-Glucose als Donor (Striepen *et al.*, 1999). Der Donor für die GalNAc-Modifikation konnte bisher nicht identifiziert werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß UDP-GalNAc nicht der direkte Donor ist, sondern ein lipophiler Überträger zwischengeschaltet ist (Tomavo *et al.*, 1992c, Hyams, 1998). Die so vorbereiteten GPI-Ankervorläufer werden schließlich in einer Transamidase-Reaktion auf naszente Proteine unter Abspaltung einer etwa 20 Aminosäurereste langen, hydrophoben C-terminalen Signalsequenz übertragen (Ferguson, 1999; Ikezawa, 2002). Die einzelnen Biosyntheseschritte bei *T. gondii* sind in Abbildung 5 zusammengefaßt.

Sowohl in Trypanosomen als auch in einer Thy-1⁺ Mauszelllinie konnte gezeigt werden, daß frühe, noch nicht mannosylierte Biosyntheseintermediate auf der cytoplasmatischen Seite des ER gefunden werden (Vidugiriene und Menon, 1993; 1994). Bestätigt werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen an verschiedenen weiteren Säugerzellen. Es wurden GPI-defiziente Mutanten identifiziert und in verschiedene Komplementationsklassen mit unterschiedlichen Genprodukten eingeteilt (Kinoshita *et al.*, 1997). So wurde für zwei Genprodukte des GlcNAc-Transferasekomplexes (PIG-A und PIG-H für Phosphatidylinositolglycan Klasse A und H; Watanabe *et al.*, 1996) und die GlcNAc-PI de-*N*-Acetylase (PIG-L; Nakamura *et al.*, 1997) eine cytosolische Orientierung nachgewiesen. Zwei weitere humane Komplementationsmutanten deuten darauf hin, daß die anschließenden Mannosylierungsschritte im Lumen des ER erfolgen: PIG-M codiert für ein Protein, das die erste Mannose auf GlcN-PI überträgt (Maeda *et al.*, 2001) und PIG-B für ein Protein, welches die dritte Mannose von GPI-Ankern überträgt (Takahashi *et al.*, 1996). Beide Gene codieren für Transmembranproteine des ER mit funktionellen Domänen, die zum Lumen des ER gerichtet sind. Bei Trypanosomen dagegen wurden auch die mannosylierten Biosyntheseintermediate zu einem überwiegenden Teil auf der cytoplasmatischen Seite nachgewiesen (Vidugiriene und Menon, 1994). Durch diese Untersuchungen wird jedoch nicht klar, auf welcher Seite des ER die Übertragung der einzelnen Mannosen erfolgt. Bisher ist es auch nicht gelungen, in dem biochemisch sehr gut untersuchten Trypanosomen-System GPI-defiziente Mutanten herzustellen. Durch Gensequenzvergleiche konnten aber einige Homologe identifiziert werden, z. B. das *T. brucei pig-B* Gen (Sütterlin *et al.*, 1998). Da es Unterschiede bei den Komponenten des GPI-Biosyntheseapparates zwischen verschiedenen Arten gibt, lassen sich nicht unbedingt Rückschlüsse vom humanen System auf protozoäre Systeme ziehen. So gibt es beispielsweise biochemische Hinweise darauf, daß die de-*N*-Acetylase und die erste

Mannosyltransferase in *T. brucei* und *Leishmania major* assoziiert sind, nicht aber in humanen Zellen (Smith *et al.*, 1997a, b; Sharma *et al.*, 1997). Diese Unterschiede bergen die Möglichkeit, spezifisch in die GPI-Biosynthese von pathogenen Organismen einzugreifen, ohne den Wirt zu schädigen (Smith *et al.*, 1997b).

Wie oben beschrieben findet die Biosynthese zumindest der frühen GPI-Ankervorläufer vermutlich auf der cytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Reticulums statt (Menon und Vidugiriene, 1994; Vidugiriene *et al.*, 1999; Kinoshita *et al.*, 1997). Die Übertragung des GPI-Ankers auf das Protein findet hingegen auf der luminalen Seite des ER statt. Deshalb wird die Existenz einer "Flippase" postuliert, die den Transport der cytosolisch gefertigten Glycolipide ins Innere des ER gewährleistet (Menon und Vidugiriene, 1994; Vidugiriene *et al.*, 1999). Bisher konnte noch keine solche Flippase gereinigt werden. Jedoch ist es kürzlich gelungen, in rekonstituierten Proteoliposomen aus Ratten-ER eine um das 15-fach erhöhte Flippase-Aktivität nachzuweisen (Gummadi und Menon, 2002).

2.11 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur intrazellulären Kompartimentierung der GPI-Anker-Biosynthese in *T. gondii* beschrieben. Ziel war es, die Orientierung der GPI-Biosyntheseintermediate in der Membran des endoplasmatischen Reticulums darzustellen. Hierzu sollte ein System aus permeabilisierten *T. gondii*-Parasiten etabliert werden, bei denen die Zellmembran sowohl für Nukleotidzucker, als auch für PI-PLC durchlässig wird, das ER jedoch intakt bleibt. GPI-Biosyntheseintermediate sollten anschließend mit radioaktiv markierten Nukleotidzuckern gebildet und ihre cytoplasmatische oder luminale Orientierung in der ER-Membran durch Behandlung mit PI-PLC geprüft werden. Nach Extraktion der verbliebenen Glycolipide sollten diese mittels Dünnschichtchromatographie dargestellt und untersucht werden. Cytoplasmatisch orientierte GPI-Biosyntheseintermediate sind in permeabilisierten Zellen zugänglich für PI-PLC, luminale nicht. In einem ersten Schritt sollte die cytoplasmatische Orientierung der frühen GPI-Biosyntheseintermediate nach Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc überprüft werden. In weiteren Schritten sollte die Orientierung der mannosylierten und anschließend der durch Seitenketten modifizierten Intermediate untersucht werden. Kenntnisse über den genauen GPI-Biosyntheseweg bei Protozoen, hier *T. gondii*, sollen genutzt werden, um Unterschiede zum Syntheseweg ihrer Wirtszellen aufzudecken. Diese Unterschiede bieten Ansatzpunkte für den Einsatz von parasiten-spezifischen Substratanaloga oder Inhibitoren, mit dem Ziel Grundlagen einer Chemotherapie protozoärer Krankheiten zu erarbeiten.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Plastikwaren, Enzyme, Feinchemikalien, Medien und Radioisotope

3.1.1 Geräte

Analysenwaage Mettler AT 250	Mettler, Rabenau-Londorf
BioImager Fujifilm BAS-1000	Raytest, Straubenhardt
Blot-Apparatur	von Keutz, Reiskirchen
DC-Platten-Scanner LB 2842	Berthold, Wildbad
Dionex-HPAEC, Typ BIO LC	Dionex, Sunnyvale, USA
Dünnschichtplatten (Si-60)	Merck, Darmstadt
Elektronenmikroskop Zeiss 109	Zeiss, Göttingen
ELISA-Reader PR 2100	Sanofi Diagnostics Pasteur, Freiburg
Entwicklermaschine Gevamatc 60	Agfa-Gevaert, Köln
Feinwaage Mettler PM 460	Mettler, Rabenau-Londorf
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiophot mit CCD-Kamera Intas Spot™	Zeiss, Göttingen
Flüssigkeitsszintillations-Zähler LS 1801	Diagnostic Instruments Inc., USA
Gelelektrophoresekammer	Beckmann, München
Gelelektrophoresekammer	Hoefer, San Francisco, USA
Geltrockner	von Keutz, Reiskirchen
Heizblock	von Keutz, Reiskirchen
Heizofen	Labor Technik Barkley, Bielefeld
Kühlzentrifuge 5417R	Holzbauer, Marburg
Kühlzentrifuge Minifuge T	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Laborlux S	Heraeus, Hanau
P4-Säulen (1 x 150 cm)	Leitz, Wetzlar
pH-Meter CG822	Vogel, Gießen
Spannungsquellen	Schott, Hofheim
Spektrophotometer Miltron Roy 3000	von Keutz, Reiskirchen
Tischzentrifuge pico	Fischer, Frankfurt
Ultramikrotom III	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Branson 3200	LKB, Stockholm, Schweden
Ultrazentrifuge TL-100 mit Rotor TLA-45	Branson, Niederlande
Vakuumkonzentrator, Typ SC 200	Beckmann, München
	Savant Instruments, San Francisco, USA

3.1.2 Plastikwaren

Gewebekulturflaschen und Plastikröhrchen wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Becton Dickinson Labware (Falcon, Lincoln Park, USA), Costar (Cambridge, USA) und Nunc (Wiesbaden-Biebrich) bezogen. Sonstige Plastikwaren stammten von den Firmen Becton Dickinson Labware, Zinser (Frankfurt), Greiner, Millipore (Eschborn), Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf), Nalge (Rochester, USA) und Eppendorf (Hamburg).

3.1.3 Enzyme

Zur Spaltung freier Glycolipide wurde Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC; E.C. 3.1.4.10) aus *Bacillus cereus* (Boehringer Mannheim) verwendet. Zur Spaltung membrangebundener Glycolipide wurde Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C aus *Bacillus thuringiensis* (Glyco, Heyford, UK) verwendet. Glycosyl-Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase D (GPI-PLD; E.C. 3.1.4.50) wurde nicht als gereinigtes Enzym eingesetzt, sondern es wurde Kaninchenserum mit GPI-PLD-Aktivität benutzt (Tierstall, Medizinisches Zentrum für Hygiene, Marburg).

3.1.4 Chemikalien

Falls nicht näher angegeben, handelte es sich bei den benutzten Chemikalien um Produkte mit den Reinheitsgraden *pro analysi* (p. a.) bzw. "für HPLC-geeignet" der Firmen: Boehringer (Mannheim), BioRad (München), Riedel-de Haen AG (Seelze), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe).

Es wurde nur entionisiertes Wasser benutzt, das durch Reinigung mittels einer Milli-Q-Filteranlage (Millipore; >10 mS) gewonnen wurde.

3.1.5 Radioaktive Substanzen

Die verwendeten radioaktiven Isotope stammten von den Firmen: Amersham (Braunschweig), ARC (St. Louis, USA) und NEN (Dreieich). Es wurden folgende tritium-markierte Isotope mit der höchsten erhältlichen spezifischen Aktivität verwandt:

D-[6- ³ H]Glucosamin Hydrochlorid,	33 Ci/mmol
D-[2- ³ H]Mannose,	13,6 Ci/mmol
Uridindiphosphat <i>N</i> -Acetyl-D-[6- ³ H]Glucosamin	60 Ci/mmol
Guanosindiphosphat-D-[6- ³ H]Mannose	60 Ci/mmol
Uridindiphosphat-[6- ³ H]Glucose	60 Ci/mmol
Uridindiphosphat <i>N</i> -Acetyl-D-[6- ³ H]Galactosamin	10 Ci/mmol

Außerdem zur radioaktiven Markierung von Proteinen:

[³⁵ S]Methionin	>1.000 Ci/mmol
-----------------------------	----------------

3.2 *In vitro*-Kultivierung von *T. gondii*-Tachyzoiten

Die Kultivierung von *T. gondii*-Tachyzoiten (im folgenden ist bei nicht näherer Bezeichnung von *T. gondii* das Stadium der Tachyzoiten gemeint) erfolgt in Vero-Zellen (Affennierenzellen). Dazu werden konfluent gewachsene Verozellkulturen mit PBS gewaschen und kurz mit Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) gespült. Nach dem Entfernen der Trypsin/EDTA-Lösung wird für ca. 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen werden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS; Quelle je nach Verfügbarkeit) aufgenommen und je nach Bedarf auf 5-12 neue Flaschen verteilt. In konfluent gewachsenen Zellkulturen wird das Medium gegen DMEM mit 2% FCS gewechselt und es werden ca. 3×10^7 Tachyzoiten zugesetzt. Nach 4 h wird das Medium erneuert und nach 48-72 h sind große Teile des Zellrasens mit *T. gondii* infiziert, nach weiteren 24 h sind alle Wirtszellen lysiert. Infizierte Zellkulturen werden nach 72 h mit einem Zellschaber abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (1.000 x g, 10 min, 4 °C) und in DMEM mit 1% FCS resuspendiert (Material aus 1-3 Zellkulturflaschen in 15 ml Medium). Die Toxoplasmen werden mittels Passage durch zunehmend feinere Kanülen (2 x 20 G, 2 x 23 G, 3 x 26 G) freigesetzt. Die Suspension wird auf eine 20 ml Glaswollsäule (2,5 g Glaswolle, equilibriert in DMEM 1% FCS) gegeben und mit PBS⁺⁺ (enthält Mg²⁺ und Ca²⁺) eluiert (Grimwood *et al.*, 1979). Sollte die Präparation noch zu stark mit Verozellmaterial verunreinigt sein (mikroskopische Kontrolle), kann erneut über eine entsprechend kleinere Glaswollsäule oder über eine Millipore Swinnex-47 Filtereinheit mit Corning Polycarbonat-Filtermembran (3 µm, Ø 47 mm) gereinigt werden. Das Eluat wird zentrifugiert (1.000 x g, 10 min, 4 °C), das Sediment zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und die Zellzahl bestimmt (Malassez Zählkammer).

3.3 Permeabilisierung von *T. gondii*-Zellen

Für alle folgenden Behandlungen werden Toxoplasmen wie unter 3.2 beschrieben aus Zellkulturen isoliert und vom Wirtszellmaterial gereinigt.

3.3.1 Behandlung mit Streptolysin O (nach Bhakdi *et al.*, 1993)

Die Parasiten werden zu einer Konzentration von 2×10^8 Parasitenäquivalenten/ml (PE/ml) mit DMEM + Proteaseinhibitoren (0,1 mM TLCK, 1 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF) resuspendiert und davon 50 µl (entspr. 1×10^7 PE) pro Ansatz pipettiert. Zu jedem Ansatz werden 1 bzw. 2 Aliquots Streptolysin O gegeben und mit DMEM + Proteaseinhibitoren ad 100 µl aufgefüllt. Streptolysin O (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Bhakdi, Mainz) ist in PBS gelöst (16 µl pro Aliquot) und wird bei -80 °C gelagert. Die erste Inkubation erfolgt für 5 min auf Eis und die Parasiten werden 5 min bei 3.400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird

die verwendete Verdünnung graphisch dargestellt, wobei die Positivkontrolle (0,2% SDS) 100% Hämolyse und die Negativkontrolle (Kaliumacetat-Puffer) 0% Hämolyse entspricht. Nach Berechnen einer linearen Regression bestimmt sich die Aktivität des Streptolysin O (in I.U./ml) aus dem Reziproken der Verdünnung bei 50% Hämolyse. Die Streptolysin O-Lösung wird dann auf 4 I.U./ml eingestellt und in Aliquots von 100 µl bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Permeabilisierung von *T. gondii* mit Streptolysin O

Es werden 5×10^7 gewaschene Parasiten pro Ansatz pipettiert und zentrifugiert ($760 \times g$, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das Parasitensediment wird mit 75 µl Kaliumacetat-Puffer + 0,1 mg/ml BSA resuspendiert. Dann werden 25 µl Streptolysin O-Lösung (4 U/ml) zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit inserieren die Streptolysin O-Moleküle in die Zellmembran der Toxoplasmen. Anschließend werden die Ansätze 2 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Durch den Temperaturanstieg können die Streptolysin O-Moleküle nun aggregieren und Poren in der Zellmembran bilden. Um ein eventuelles Eindringen von Streptolysin O durch die entstandenen Poren zu verhindern, können die Parasiten gewaschen werden, bevor die Porenbildung initiiert wird. Die permeabilisierten Toxoplasmen werden abzentrifugiert ($760 \times g$, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und zweimal mit eiskaltem Kaliumacetat-Puffer gewaschen. Die abschließende Resuspension der Parasiten erfolgt in einem für den weiteren Verlauf angezeigten Puffer (s. 3.4).

3.3.4 Behandlung mit Digitonin

Herstellen der Stammlösung: Es werden 8 mg/ml Digitonin (Sigma) in Wasser gegeben und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung filtriert (0,4 µm Spritzenvorsatzfilter), um ungelöste Partikel zu entfernen. Die Lagerung erfolgt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, die Lösung ist eine Woche haltbar. Zum Herstellen der Gebrauchslösung (40 µg/ml) wird die Stammlösung 1:200 in Kaliumacetat-Puffer (s. 3.3.3) verdünnt.

Pro Ansatz werden 5×10^7 gewaschene Parasiten pipettiert, zentrifugiert ($760 \times g$, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und mit 100 µl Digitonin (40 µg/ml) resuspendiert. Die Inkubation erfolgt 1 min auf Eis. Die Toxoplasmen werden anschließend abzentrifugiert ($760 \times g$, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und zweimal mit eiskaltem Kaliumacetat-Puffer gewaschen.

3.3.5 Behandlung mit hypotonem Puffer

Die gewaschenen und gezählten Parasiten werden zentrifugiert ($1.000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und mit so viel hypotonem Lysispuffer (Wasser mit 1 µg/ml Leupeptin, 0,1 mM Tosyllysinchloromethylketon (TLCK), 0,2 µg/ml Tunicamycin) aufgenommen, um eine Parasitenkonzentration von 2×10^9 PE/ml zu erhalten, und anschließend in einen eisgekühlten Homogenisator nach Dounce ("tight fitting"; Wheaton, USA) überführt.

Nach zehnmütigem Quellen auf Eis werden die Zellen mit 10 Schlägen homogenisiert, 1:2 mit doppelt-isotonem Inkubationspuffer aufgefüllt und durch weitere 5 Schläge des Dounce-Homogenisators gemischt. Je nach Verwendungszweck (s. 3.4) wird diese Präparation direkt eingesetzt oder zweimal mit isotonem Inkubationspuffer A bzw. B gewaschen (Zentrifugation s. o.).

hypotoner Lysispuffer:	Wasser
	0,1 mM TLCK
	1 µg/ml Leupeptin
	0,2 µg/ml Tunicamycin
(TLCK und Leupeptin sind Protease-Inhibitoren)	
doppelt-isotoner Inkubationspuffer:	100 mM Na-HEPES, pH 7,4
	50 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MnCl ₂
Inkubationspuffer A: (für die Markierung früher GPI-Biosyntheseintermediate)	50 mM Na-HEPES, pH 7,4
	25 mM KCl
	5 mM MgCl ₂
	8 mM EDTA
	0,1 mM TLCK
	1 µg/ml Leupeptin
	0,2 µg/ml Tunicamycin
Inkubationspuffer B: (für die Markierung mannosylierter GPI-Biosyntheseintermediate)	50 mM Na-HEPES, pH 7,4
	25 mM KCl
	5 mM MgCl ₂
	5 mM MnCl ₂
	0,1 mM TLCK
	1 µg/ml Leupeptin
	0,2 µg/ml Tunicamycin

3.3.6 Überprüfen der Permeabilisierung (Propidiumjodid-Färbung)

Permeabilisierte Toxoplasmen werden zu einer Konzentration von 1×10^8 PE/ml in PBS resuspendiert und mit einer 1 mg/ml Propidiumjodid-Lösung versetzt (Endkonzentration 10 µg/ml). Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 4 °C in der Dunkelheit. Das Propidiumjodid wird durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt (1.000 x g, 5 min, 4 °C). Der Anteil der Zellen, der positiv für eine Kernfärbung ist, wird mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

3.4 Markierung von GPI-Biosyntheseintermediaten

Die im folgenden beschriebenen Markierungen von Glycolipiden mit aktivierten Nukleotidzuckern entspricht weitgehend der Markierung im zellfreien System (mod. nach Masterson *et al.*, 1989). Zellfreie Systeme werden in besonderem Maße bei den Untersuchungen zur Biosynthese von GPI-Ankern eingesetzt (Masterson *et al.*, 1989; Mayor *et al.*, 1990a; 1990b). Sie erlauben den Einsatz von spezifischen Glycosylierungsinhibitoren, die nicht in intakte Zellen gelangen, und ermöglichen radioaktive Markierungen mit aktivierten Vorläufern, z. B. Nukleotidzuckern. Zellfreie Systeme erlauben darüber hinaus besonders gut die Markierung von GPI-Anker-Biosyntheseintermediaten. Die Markierbarkeit von niedrig glycosylierten Intermediaten ist in der Regel in zellfreien Systemen deutlich besser als bei *in vivo*-Markierungen, wie z. B. bei *T. b. brucei* und *T. gondii*. Weiterhin können durch den Einsatz bestimmter Nukleotidzucker ganz gezielt bestimmte GPI-Anker-Biosyntheseintermediate markiert werden, vorausgesetzt man kennt ihre genaue Zusammensetzung.

3.4.1 Markierung früher GPI-Biosyntheseintermediate (Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc)

Zur Markierung früher GPI-Biosyntheseintermediate werden die hypoton lysierten Parasiten zweimal mit isotonem Inkubationspuffer A (ohne MnCl₂, mit 8 mM EDTA) gewaschen (1.000 x g, 10 min, 4 °C). Durch das Entfernen zweiwertiger Kationen, vor allem Mn²⁺, werden die Mannosylierungsschritte der GPI-Biosynthese durch Inhibition der Dolichyl-Phosphomannose-Synthase verhindert und die frühen, nicht mannosehaltigen Intermediate akkumulieren (Schutzbach und Zimmerman, 1992). Die Parasitenpräparation wird zu 100 µl (entspr. 1 x 10⁸ PE/Ansatz) aliquotiert, jeder Ansatz mit 1,5-3 µCi UDP-[³H]GlcNAc, 1 µl 100 mM ATP und 1 µl 100 mM Coenzym A supplementiert, gemischt und anschließend für 30-120 min (typischerweise 90 min) bei 37 °C inkubiert. Stoppen der Reaktionen durch Plazieren auf Eis.

3.4.2 Markierung höher glycosylierter und modifizierter GPI-Biosyntheseintermediate (Markierung mit GDP-[³H]Man, UDP-[³H]GalNAc und UDP-[³H]Glc)

Zur Markierung höher glycosylierter bzw. modifizierter GPI-Biosyntheseintermediate werden die hypoton lysierten Parasiten zweimal mit isotonem Inkubationspuffer B (mit MnCl₂) gewaschen (1.000 x g, 10 min, 4 °C). Die Parasitenpräparation wird zu 100 µl (entspr. 1 x 10⁸ PE/Ansatz) aliquotiert, jeder Ansatz mit 1 µl 100 mM UDP-GlcNAc, 1 µl 100 mM ATP, 1 µl 100 mM Coenzym A und, je nach verwendeter radioaktiver Komponente, mit 1 µl 100 mM UDP-GalNAc, 1 µl 100 mM UDP-Glc und/oder 1 µl 100 mM GDP-Man supplementiert. Abschließend wird die Radioaktivität hinzugefügt (2-4 µCi GDP-[³H]Man, 4-8 µCi UDP-[³H]GalNAc

bzw. 3-6 μCi UDP- $[\text{}^3\text{H}]\text{Glc}$ pro Ansatz), gemischt und für 30-120 min (typischerweise 120 min) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Plazieren auf Eis gestoppt.

3.5 Behandlung mit PI-PLC

Den radioaktiv markierten Proben wird 1 μl H₂O bzw. 1 μl 10% Triton X-100 (Positivkontrolle; Endkonzentration: 0,1% Triton X-100) und anschließend 1 μl PI-PLC (*B. thuringiensis*; Endkonzentration: 3 U/ml) bzw. 1 μl PI-PLC-Puffer (Negativkontrolle) zugesetzt. Die Proben werden für 30 min auf Eis inkubiert, durch Zugabe von 700 μl Chloroform/Methanol (C/M 1:1, v/v) wird die Reaktion gestoppt. Dies ist gleichzeitig der erste Schritt der Glycolipidextraktion (s. 3.12.2).

PI-PLC-Puffer:	25 mM Tris-Acetat; pH 7,4
	50% Glycerin
	0,01% Azid

3.6 Kontrollen zur Integrität der permeabilisierten Parasiten

Zur Kontrolle des Systems aus permeabilisierten Parasiten muß gezeigt werden, daß die äußere Zellhülle für verschiedene Moleküle durchlässig wird, jedoch die Integrität der Zellkompartimente, insbesondere des ER, erhalten bleibt.

3.6.1 β -Galactosidase-Test

Um die Permeabilisierung von Parasiten und das Austreten von cytoplasmatischem Inhalt nach der hypotonen Behandlung darzustellen, wurde der klonale Stamm RH β -1 verwendet (freundlicherweise von Herrn Dr. Frank Seeber, Marburg, zur Verfügung gestellt). Dieser Stamm ist mit dem *lacZ*-Gen transfiziert und exprimiert stabil im Cytosol β -Galactosidase von *E. coli* (Seeber und Boothroyd, 1996). Aliquots von 5×10^6 PE/100 μl hypoton permeabilisierter bzw. intakter RH β -1 Toxoplasmen werden zentrifugiert (1.000 x g, 10 min, 4°C). 2 μl (entspr. 1×10^5 PE) des Überstandes werden in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (U-Form) pipettiert und mit PBS ad 50 μl aufgefüllt. Das Parasitensediment wird im Ausgangsvolumen resuspendiert und entsprechende Mengen parallel zu den Überständen aufgetragen. Durch Zugabe von Triton X-100 (0,1% Endkonzentration) kann eine vollständige Lyse der Parasiten erreicht werden (Positivkontrolle). Zu jedem Ansatz werden 50 μl Chlorophenol Rot- β -D-Galactopyranosid (CPRG, Boehringer Mannheim) in 100 mM HEPES pH 8,0 zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 10–30 min (je nach Farbentwicklung) bei 37 °C und wird mit 20 μl Stopp-Lösung (25 mM EDTA, 500 mM Glycin pH 11,2) gestoppt. Die Auswertung erfolgt an einem ELISA-Reader (Sanofi, Freiburg; s. u.) bei 570 nm.

3.6.2 Protease-Schutztest

Hypoton permeabilisierte Parasiten werden mit Inkubationspuffer gewaschen (3.3.5) und mit 45 µl PBS⁺⁺ vorsichtig resuspendiert. Es werden 2,5 µl H₂O bzw. 2,5 µl 2% Triton X-100 (Positivkontrolle) und anschließend 2,5 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml; Endkonzentration: 500 µg/ml) bzw. Proteinase K-Puffer (Negativkontrolle) pro Ansatz zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 30 min auf Eis und wird durch Zugabe von 300 µl 4 mM PMSF in H₂O gestoppt. Die PMSF-Lösung muß jeweils frisch aus einer Stammlösung (200 mM PMSF in 95% Ethanol) hergestellt werden. Anschließend erfolgt sofort eine Proteinpräzipitation durch Zugabe von 400 µl eiskalter 14% Trichloressigsäure und Fällung für 30 min auf Eis. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation sedimentiert (10.000 x g, 15 min, 4 °C) und das Sediment zweimal in 500 µl tiefgekühltem Aceton resuspendiert, für mindestens 30 min bei – 80 °C gelagert und jeweils wie oben angegeben zentrifugiert. Das resultierende Sediment wird in 50 µl H₂O resuspendiert, mit 20 µl vierfachem Probenpuffer versetzt und sofort gekocht. Die Analyse der Proben erfolgt mittels SDS-PAGE Immunoplot.

Proteinase K-Puffer:	50 mM Tris-HCl; pH 8,0 1 mM CaCl ₂	
Probenpuffer (4-fach):	Tris/HCl, 2 M; pH 6,8 SDS 20% Glycerin H ₂ O BPB 0,2%	1,88 ml 6,00 ml 4,50 ml 2,12 ml 2,00 ml

3.6.3 Elektronenmikroskopie

Pro Ansatz für die Elektronenmikroskopie werden 5-10 x 10⁷ freie Toxoplasmen sedimentiert (1.000 x g, 2 min 4 °C) und mit 1 ml 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer pH 7,4 aufgenommen. Nach 5 min bei Raumtemperatur werden die Parasiten abzentrifugiert (13.000 x g, 15 min, RT) und weitere 2 h bei Raumtemperatur zum Fixieren stehengelassen. Nach Entfernen des Überstandes wird das Sediment vorsichtig zweimal mit Cacodylat-Puffer gewaschen (13.000 x g, 5 min, RT), für eine Stunde in 0,25% Tanninsäure in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer pH 7,4 stehengelassen und erneut zweimal mit Cacodylat-Puffer gewaschen. Eine Nachfixierung erfolgt für 2 h mit 1% Osmiumtetroxid in Cacodylat-Puffer bei Raumtemperatur. Die Dehydrierung des Zellmaterials erfolgt durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Die Parasiten werden dafür je 3 x für 10 min in 50%, 70%, 96%, 100% Ethanol und Propylenoxid bei Raumtemperatur inkubiert. Die Einbettung erfolgt in Epon 812 (Serva, Heidelberg) für 2 h bei Raumtemperatur (vollständige Polymerisation bei 60 °C für 1-3 Tage).

Ultradünne Schnitte werden an einem Ultramikrotom (LKB, Stockholm, Schweden) angefertigt und mit 1% Uranylacetat in 50% Aceton gefolgt von Bleicitrat gefärbt. Die Untersuchung der Schnitte erfolgt an einem Zeiss Elektronenmikroskop (Zeiss, Göttingen).

3.7 SDS-Gelelektrophorese

Es werden nach der Standardmethode von Laemmli (1970) Gele gegossen. Das 10%ige Trenngel (s. u.) polymerisiert durch den Zusatz von 50 μ l Ammoniumpersulfat (APS; 100 mg/ml) und 10 μ l N,N,N',N'-Tetrametylendiamin (TEMED) pro 15 ml Gellösung. Das 5%ige Sammelgel (s. u.) wird mit 25 μ l Ammoniumpersulfat und 5 μ l TEMED polymerisiert.

Die Proben aus 3.6.2 werden zentrifugiert (14.000 x g, 5 min, RT) und ein Aliquot in eine Tasche des Sammelgels pipettiert. Bei anschließendem Transfer auf PVDF-Membranen werden 8 μ l Probe (entspr. 1×10^7 PE) pro Tasche aufgetragen, bei Transfer auf Nitrocellulose werden $2,5 \times 10^6$ PE pro Tasche aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker dient ein Wide Range Marker, der ein Proteingemisch in den Größen von 6,5-205 kDa enthält (Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Stromstärke von 25 mA/Gel.

Trenngel (10%):	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	5,00 ml
	Tris/HCl, 1,5 M; pH 8,8	5,60 ml
	SDS 10%	0,15 ml
	H ₂ O	4,35 ml
Sammelgel (5%):	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	0,50 ml
	Tris/HCl, 1 M; pH 6,8	625 μ l
	SDS 10%	50 μ l
	H ₂ O	3,85 ml
Probenpuffer (2-fach):	Tris/HCl, 1 M; pH 6,8	1,88 ml
	SDS 10%	6,00 ml
	Glycerin	3,00 ml
	H ₂ O	2,12 ml
	1,5 M DTT/0,1% BPB bzw. BPB 0,1%	2,00 ml
Laufpuffer:	Tris/HCl, 100 mM	250 ml
	Glycin, 1 M	200 ml
	SDS 10%	10 ml
	H ₂ O	540 ml

3.8 Färbung von SDS-Gelen mit Silbernitrat (AgNO_3)

Das SDS-Gel wird jeweils 30 min in den Lösungen 1, 2 und 3 bewegt. Hierbei werden die Proteine denaturiert und fixiert. Anschließend wird ca. 10 x für 10-15 min in Wasser gewaschen, bevor das Gel erneut für jeweils 30 min in den Lösungen 4 und 5 bewegt wird, wobei die Disulfidbrücken durch Reduktion gelöst werden. Das Gel wird mit Wasser und zweimal mit wenig Lösung 6 abgespült, bevor es in der Lösung 6 entwickelt wird (ca. 2-5 min; Farbentwicklung beobachten). Die Reaktion wird durch Zugabe von Zitronensäure (Lösung 7) gestoppt. Hinterher wird das Gel einige Male mit Wasser gewaschen, bevor es im Vakuumtrockner auf Filterpapier aufgetrocknet wird.

Lösung 1:	Methanol	25 ml
	Essigsäure	5 ml
	H ₂ O	ad 50 ml
Lösung 2:	Methanol	2,5 ml
	Essigsäure	5 ml
	H ₂ O	ad 50 ml
Lösung 3:	Glutardialdehyd 25%	20 ml
	H ₂ O	ad 50 ml
Lösung 4:	DTT (10 mg/ml)	50 µl
	H ₂ O	ad 50 ml
Lösung 5:	AgNO ₃	50 mg
	H ₂ O	ad 50 ml
Lösung 6:	Na ₂ CO ₃	3 g
	Formaldehyd 37%	50 µl
	(kurz vor Gebrauch zusetzen)	
	H ₂ O	ad 100 ml
Lösung 7:	Zitronensäure	4,83 g
	H ₂ O	10 ml

3.9 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose/PVDF-Membran und immunologische Färbung (Western-Blot) (modifiziert nach Towbin *et al.*, 1979)

3.9.1 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose oder PVDF-Membran

Zwischen zwei Graphitelektroden werden 6 Filterpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel), eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) bzw. eine PVDF-Membran (BioRad, München), das SDS-Gel und sechs weitere Filterpapiere übereinander geschichtet. Die Filterpapiere und die Nitrocellulose werden zuvor einige Minuten in Transferpuffer getränkt. Wird eine PVDF-Membran benutzt, wird diese zuvor in Methanol getränkt. Die untere Elektrode wird an den Pluspol, die obere an den Minuspol einer Stromquelle angeschlossen. Für 2 Stunden wird eine Spannung angelegt, die einen Strom von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membran fließen läßt. Nach dem Transfer können die Proteine mit Ponceau Rot (1% Ponceau Rot in 5% Essigsäure) angefärbt werden, um die Probenspuren besser erkennen zu können. Die Membran wird in Streifen zerschnitten, die Markerspuren mit Coomassie gefärbt (s. 3.9.2) und die Probenspuren nach dem Western-Blot-Verfahren immunologisch gefärbt.

Transfer-Puffer:	Tris/HCl	50 mM
	Glycin	40 mM
	SDS	0,0375%
	Methanol	20%

3.9.2 Coomassie-Färbung der Markerspuren:

Die Membran wird für 6 min unter gelegentlichem Schwenken in der Farbstofflösung gefärbt, wobei die Proteine gleichzeitig fixiert werden. Anschließend wird die Membran 7 min in dem Entfärber 1 und dann mindestens 15 min in dem Entfärber 2 geschwenkt. Die Membran kann nun getrocknet und die Molekulargewichtsstufen können abgelesen werden.

Coomassie-Färbelösung:	Coomassie-Brilliant Blue R 250 (Merk)	0,6 g
	Ethanol	250 ml
	Eisessig	100 ml
	H ₂ O	ad 600 ml
Entfärber 1:	Ethanol	35%
	Essigsäure	10%
	H ₂ O	55%

Entfärber 2:	Ethanol	10%
	Essigsäure	10%
	H ₂ O	80%

3.9.3 Inkubation mit Antikörpern

Färbung auf Nitrocellulose:

Die Membran wird für eine Stunde in 5% Trockenmilch in PBS/0,05% Tween 20 gesättigt. Danach wird mit monoklonalen Antikörpern (aus dem Kaninchen) in der Verdünnung 1:500 (1% BSA in PBS/0,05% Tween 20) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem kurzen Abspülen mit A. bidest und drei Waschschritten à 5 Minuten mit 1% Trockenmilch in PBS/0,05% Tween 20 wird zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper, einem anti-Kaninchen-alkalische-Phosphatase-Konjugat (1:2500 verdünnt mit 1% Trockenmilch in PBS/0,05% Tween 20) inkubiert. Nach erneutem Waschen (s. o.) werden die Substrate 33 µl Nitro-Blau-Tetrazolium-(NBT-) und 16,5 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat- (BCIP-)Lösung in 15 ml Substratpuffer zugegeben und für 5-45 Minuten je nach Farbentwicklung inkubiert. Durch Waschen mit Wasser wird die Färbung beendet.

Substrat-Puffer pH 9,5:	Tris/HCl	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	MgCl ₂	5mM

Färbung auf PVDF-Membran:

Die Membran wird für eine Stunde in 5% Trockenmilch in PBS/0,05% Tween 20 gesättigt. Danach wird mit monoklonalen Antikörpern (aus dem Kaninchen) in der Verdünnung 1:100 (1% BSA in PBS/0,05% Tween 20) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem kurzen Abspülen mit A. bidest und drei Waschschritten à 5 Minuten mit 1% Trockenmilch in PBS/0,05% Tween 20 wird zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper, ein anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat (1:50.000 verdünnt mit 1% Trockenmilch in PBS/0,05% Tween 20) inkubiert. Nach erneutem Waschen (s. o.) wird das Peroxidase-Chemolumineszenz-Substrat (ECL-System, Amersham, Braunschweig) auf die Membran gegeben. Die beiden Reagenzien werden 1:1 gemischt und die Membran für 5 min darin entwickelt. Die Membran wird in Folie eingeschweißt. Nach einer Wartezeit von 20 min wird durch das Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak BioMax™ MR, Frankfurt) die Lumineszenz aufgenommen und durch Entwickeln sichtbar gemacht. Die Expositionsdauer ist dabei abhängig von der Stärke der Reaktion.

3.10 Markierung mit tritiiertem Glucosamin

Zur Konfluenz gewachsene Vero-Zellkulturen (175 cm²) werden mit 4-6 x 10⁷ Toxoplasmen infiziert. Nach 48-72 Stunden wird das Medium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit je 5 ml Markierungsmedium (ohne Radioaktivität) gewaschen. Anschließend werden 10 ml Markierungsmedium, das 500 µCi [³H]Glucosamin enthält, zugegeben und für 9 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das zuckerfreie Markierungsmedium enthält als Kohlenstoffquelle Pyruvat. Um die Umsetzung des Pyruvats zu toxischen Derivaten zu vermeiden, wird das Markierungsmedium durch Einleiten von CO₂ leicht angesäuert.

Zuckermarkierungsmedium: DMEM ohne Glucose (2 x konz.)	20 ml
200 mM Pyruvat-Lösung	488 µl
100 mM Glutamin-Lösung	200 µl
H ₂ O	19,3 ml

Nach der Markierung werden die Parasiten wie unter 3.2 beschrieben aufgearbeitet und gereinigt, und die Glycolipide wie unter 3.12 beschrieben extrahiert.

3.11 Markierung mit sulfuriertem Methionin

Bei Toxoplasmakulturen wird 48-72 Stunden nach Infektion das Medium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit je 5 ml Markierungsmedium (ohne Radioaktivität) gewaschen. Anschließend werden 10 ml Markierungsmedium, das 500 µCi [³²S]Methionin enthält, zugegeben und für 11 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Proteinmarkierungsmedium: DMEM ohne Methionin (2 x konz.)	20 ml
H ₂ O	20 ml

Nach der Markierung werden die Parasiten wie unter 3.2 beschrieben aufgearbeitet und gereinigt.

3.12 Extraktion von Glycolipiden

Eine sequentielle Extraktion mit Chloroform/Methanol (C/M) gefolgt von Chloroform/Methanol/Wasser (C/M/W) (Menon *et al.*, 1990b, Field und Menon, 1992) erlaubt in der Regel die Trennung von nicht-ethanolaminphosphathaltigen GPI-Anker-Biosyntheseintermediaten (C/M-Extrakt) und ethanolaminphosphathaltigen GPI-Ankervorläufern (C/M/W-Extrakt) in die beiden organischen Extrakte. Sie ist somit beispielsweise für die Extraktion von GPIs aus *T. b. brucei* (Mayor *et al.*, 1990a; 1990b) oder auch *T. gondii* (Tomavo *et al.*, 1992a, 1992b, Striepen *et al.*, 1997) von Vorteil.

Für einige besonders hydrophile bzw. hydrophobe GPI-Anker-Biosyntheseintermediate gilt diese Aufteilung jedoch nicht. Im Fall der GPIs von *P. falciparum* (Gerold *et al.*, 1994) oder *P. yoelii* (Kimmel *et al.*, 2003) beispielsweise führt eine sequentielle Extraktion der GPIs nicht zu dieser Trennung. In den meisten Fällen wurde die weniger aufwendige und effektive Ein-Schritt-Extraktion verwendet, da durch die selektive Markierung bestimmter Glycolipide eine Auftrennung der beiden Glycolipid-Species nicht erforderlich ist.

3.12.1 Ein-Schritt-Extraktion von Glycolipiden (mod. nach McDowell und Schwarz, 1988)

Das Volumen des Parasitensediments wird abgeschätzt und 6,7 Volumenteile C/M (1:1, v:v) zugegeben, so daß der Wasseranteil der Parasiten zu einem Mischungsverhältnis von C/M/W (10:10:3, v:v) führt. In typischen Experimenten entspricht die Zugabe von C/M 700 µl. Diese Suspension wird für 5 min beschallt, 1 h bei Raumtemperatur extrahiert und anschließend zentrifugiert (2.800 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wird abgenommen und das Sediment erneut zweimal mit je 0,5 ml C/M/W (10:10:3, v:v) extrahiert. Die Überstände werden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Der C/M/W-Extrakt enthält neben den an der posttranslationalen Modifikation beteiligten Glycolipiden noch Phospho- und einige Sphingolipide. Um den Großteil der Phospholipide aus den C/M/W-Extrakten zu entfernen, werden die Extrakte in C/M (2:1, v:v) resuspendiert und anschließend "Folch"-gewaschen (Sharma *et al.*, 1974). Dazu werden die C/M/W-Extrakte der einzelnen Ansätze mit $\frac{1}{5}$ Volumen eiskaltem 4 mM MgCl₂ gemischt und zentrifugiert (2.800 x g, 2 min, 4 °C). Die Überstände werden abgenommen und die chloroformreichen Unterphasen noch zweimal mit $\frac{1}{2}$ Volumen, eiskalter "Künstlicher Oberphase" gewaschen. Die wässrigen "Folch-Überstände" enthalten hauptsächlich Nukleotidzucker und Zucker-Phosphate als radioaktive Komponenten. Die Unterphasen werden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 200 µl wassergesättigtem 1-Butanol aufgenommen. Um noch vorhandene wasserlösliche Komponenten zu entfernen, werden die Butanol-Phasen zweimal mit dem gleichen Volumen Wasser, anschließend die wässrigen Phasen mit einem Volumen wassergesättigtem 1-Butanol gewaschen. Die gewaschene Butanol-Phase enthält u. a. radioaktiv markierte GPIs und Dolichol-Phosphat-Zucker. Darüber hinaus enthält die Butanol-Phase auch noch Phospholipide, die jedoch mit Zuckern nicht radioaktiv markierbar sind und daher auch radioaktiv nicht in Erscheinung treten. Die Butanol-Phasen werden vereinigt und die Radioaktivität eines Aliquots der Probe im Flüssigkeitsszintillations-Zähler (LSC) bestimmt.

Künstliche Oberphase:	Chloroform	30 ml
	Methanol	480 ml
	Wasser	470 ml
	1M MgCl ₂	1,68 ml

3.12.2 Zwei-Schritt-Extraktion von Glycolipiden (mod. nach Field und Menon, 1992)

Etwa 2×10^8 Tachyzoiten werden in Glasröhrchen auf Eis in 2 ml C/M (2:1, v:v) durch Rühren und Ultraschallbehandlung suspendiert und 1 h extrahiert. Nach Zentrifugation ($2.800 \times g$, 10 min, 4 °C) wird der Extrakt abgenommen und das Sediment ein zweites Mal extrahiert. Beide Extrakte werden als C/M-Extrakt vereinigt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 1-Butanol resuspendiert. Das Sediment der C/M-Extraktion wird wie oben beschrieben zweimal mit je 1 ml C/M/W (10:10:3, v:v) extrahiert und die beiden Extrakte als C/M/W-Extrakt vereinigt. Der C/M/W-Extrakt wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet und der Rückstand zwischen 750 µl wassergesättigtem 1-Butanol und 750 µl Wasser verteilt. Die Wasserphase wird erneut mit 750 µl wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert und mit der ersten organischen Phase als Butanol-Phase vereinigt. Um die Radioaktivität zu bestimmen, wird ein Aliquot der Butanol-Phasen beider Extrakte im Flüssigkeitsszintillations-Zähler (LSC) gemessen. Die Extrakte werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.13 Dünnschichtchromatographie

3.13.1 Vorbereiten der Dünnschichtplatten

Die von der Firma Merck gelieferten Si-60 Platten ($10 \times 20 \text{ cm}^2$ oder $20 \times 20 \text{ cm}^2$) müssen, um optimale Trennleistungen zu erhalten, vorbehandelt werden. Dazu läßt man die Platten unter Kennzeichnung der Laufrichtung in Methanol vorlaufen. Schmutz- und Hilfsstoffe sowie Wasser werden dabei zum Ende der Platte getragen. Nach dem Verdunsten des Methanols werden die Platten für 2 h bei 120 °C getrocknet und anschließend in einem Exsikkator bis zum Gebrauch über Trocknungsmittel (Silicagel mit Indikator) gelagert.

3.13.2 DC-Systeme zur Analyse von Glycolipiden

Die dünnschichtchromatographischen (DC) Analysen der verschiedenen Glycolipidextrakte erfordern verschiedene DC-Systeme (s. u.). Mit einem weichen Bleistift wird 2 cm vom unteren Rand eine Linie gezogen, die als Auftragslinie dient. Am Ende der Laufstrecke von 16 cm wird ein schmaler Streifen des Plattenmaterials entfernt, um eine gleichmäßige Laufstrecke zu gewährleisten. Die Proben werden mit einem Mindestabstand von 1 cm aufgetragen. Die Proben werden gegebenenfalls getrocknet und in einem geeigneten Lösungsmittelgemisch (C/M 1:1, v:v oder C/M/W

10:10:3, v:v) resuspendiert. Der Probenauftrag erfolgt mittels 5 µl-Mikrokapillarpipetten (Hirschmann, Eberstadt). Die Komponenten des jeweiligen Laufmittels (s. u.) werden exakt im angegebenen Verhältnis gemischt und anschließend in eine Chromatographiekammer mit darin aufgestelltem Filterpapier gegeben. Damit die flüchtigen Komponenten des Laufmittels nicht verdunsten, wird die Chromatographiekammer schnell geschlossen. Zum besseren Äquilibrieren wird die Kammer kurz geschüttelt und für 5 min stehen gelassen, erst dann werden die DC-Platten hineingestellt. Sobald die gesamte Lauffront die obere Ausschabung erreicht hat, werden die DC-Platten aus der Kammer genommen und das auf den Platten verbliebene Laufmittel im Abzug verdunstet.

Laufmittelsystem A

Ein besonders für die Analyse der geringer glycosylierten, C/M-extrahierbaren Glycolipide (GlcN-(acyl)PI bis Man₃-GlcN-PI) und Phospholipide geeignetes Laufmittel ist Chloroform/Methanol/1 M Ammoniumhydroxyd (10:10:3; v:v) in Verbindung mit Si-60 Platten (Field und Menon, 1992).

Laufmittelsystem B

Das Laufmittelsystem B eignet sich besonders für die Auftrennung der C/M/W-extrahierbaren Glycolipide (insbesondere der ethanolaminhaltigen GPI-Ankervorläufer), sowie der gesamten in einem Schritt extrahierten Glycolipide. Es setzt sich wie folgt zusammen: n-Hexan/C/M/W/Essigsäure (3:10:10:2:1; v:v) in Verbindung mit Si-60 Platten (Striepen *et al.*, 1997). Nach dem Abtrocknen des Laufmittels werden die Platten für 15 min in einer Kammer neutralisiert, die mit 32% Ammoniak äquilibriert ist.

3.13.3 Detektion und Quantifizierung von Radioaktivität auf DC-Platten

Der Nachweis von Radioaktivität auf DC-Platten erfolgt durch einen DC-Platten-Radioaktivitätsscanner LB 2842 (Berthold) unter Verwendung von Argon/Methan (90% / 10%) als Zählgas und mit einem dazugehörigen Programm zur Auswertung der Radioaktivitätsverteilung (Chroma, Berthold). Das Programm kann außerdem dazu genutzt werden, einzelne Glycolipide im Radioaktivitätsprofil zu integrieren und quantitative Auswertungen durchzuführen.

Zusätzlich wurde zur Detektion und Quantifizierung von Radioaktivität auf ausgewählten DC-Platten ein Bio-Imager (Raytest, Straubenhardt) mit der dazugehörigen Software (Tina 2.09g, Raytest) eingesetzt.

3.13.4 Statistische Auswertung der Spaltungseffizienz

Einzelne Glycolipide werden wie oben beschrieben quantifiziert. PI-PLC-insensitives Material kann als interner Standard zur Normalisierung verschiedener Ansätze innerhalb eines Markierungsexperimentes genutzt werden, z. B. GlcN-(acyl)-PI

bei der Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc, Dol-P-Man bei der Markierung mit GDP-[³H]Man und Dol-P-Glc bei der Markierung mit UDP-[³H]Glc. Die Anteile der einzelnen Glycolipide aus der Negativkontrolle (ohne PI-PLC Behandlung, ohne Detergenz) werden jeweils auf 100% festgelegt und anschließend die prozentuale Spaltung der einzelnen GPIs nach PI-PLC Behandlung berechnet. Die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen, ihre graphische Darstellung sowie die Berechnung der Signifikanz (t-Test) erfolgt mit dem Programm SigmaPlot 4.0 (Jandel Scientific).

3.14 Charakterisierung von Glycolipiden als GPIs

Organische Extrakte, die auf die unter 3.12 beschriebene Weise hergestellt werden, können u. a. Glycosphingolipide, Dolicholzyklusintermediate und Glycosyl-Phosphatidylinositole enthalten. Die GPIs lassen sich aufgrund verschiedener enzymatischer und chemischer Reaktionen identifizieren und von den anderen Glycolipiden unterscheiden. Zu den aussagekräftigsten Behandlungen zählen die Spaltungen mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC), Glycosyl-Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase D (GPI-PLD) und Phospholipase A₂ (PLA₂). GPIs sind die einzigen im Tierreich ubiquitär verbreiteten, zellulären Glycokonjugate, die ein nicht-acetyliertes Hexosamin enthalten. Dieses nicht-acetylierte Hexosamin kann durch salpetrige Säure deaminiert und daraufhin spezifisch gespalten werden. Daher ist die Sensitivität gegenüber der Behandlung mit salpetriger Säure (HNO₂; s. 3.14.2) ebenfalls diagnostisch für GPIs. Weitere Untersuchungen zur Strukturaufklärung von GPIs umfassen Spaltungen mit Kali- (KOH) bzw. Natronlauge (NaOH) zum Nachweis verseifbarer Fettsäuren und wässriger Flußsäure (HF) zur Identifizierung von Phosphodiesterbindungen (Abb. 6).

3.14.1 Identifizierung von GPIs mittels enzymatischer Behandlungen

Phosphatidylinositol-spezifische Hydrolasen können verwendet werden, um GPI-Strukturen zu identifizieren und definierte Fragmente aus GPIs freizusetzen. PI-PLC (E.C. 3.1.4.10) spaltet GPIs, die kein modifiziertes Inositol tragen und setzt dabei die hydrophobe Komponente und das Phosphoinositol-Glycanfragment frei. GPI-PLD (E.C. 3.1.4.50) spaltet GPIs unabhängig davon, ob das Inositol des GPIs modifiziert ist oder nicht. Dieses Enzym setzt dabei die phosphorylierte hydrophobe Komponente und das Inositolglycan frei (Abb. 6).

Die Quelle der verschiedenen Enzyme ist von entscheidender Bedeutung. PI-PLC aus *B. cereus* (Boehringer; etwa 0,5 U je Ansatz) und PLA₂ aus Bienengift (Sigma; etwa 50 U je Ansatz) erkennen und spalten GPIs sehr effektiv. Enzyme aus anderen Quellen sind z. T. nicht aktiv gegenüber GPIs. GPI-PLD wird nicht als gereinigtes Enzym eingesetzt. Die Behandlung erfolgt durch Zugabe von 5 µl Kaninchen-Serum (Field und Menon, 1993), das GPI-PLD-Aktivität enthält (Davitz *et al.*, 1989).

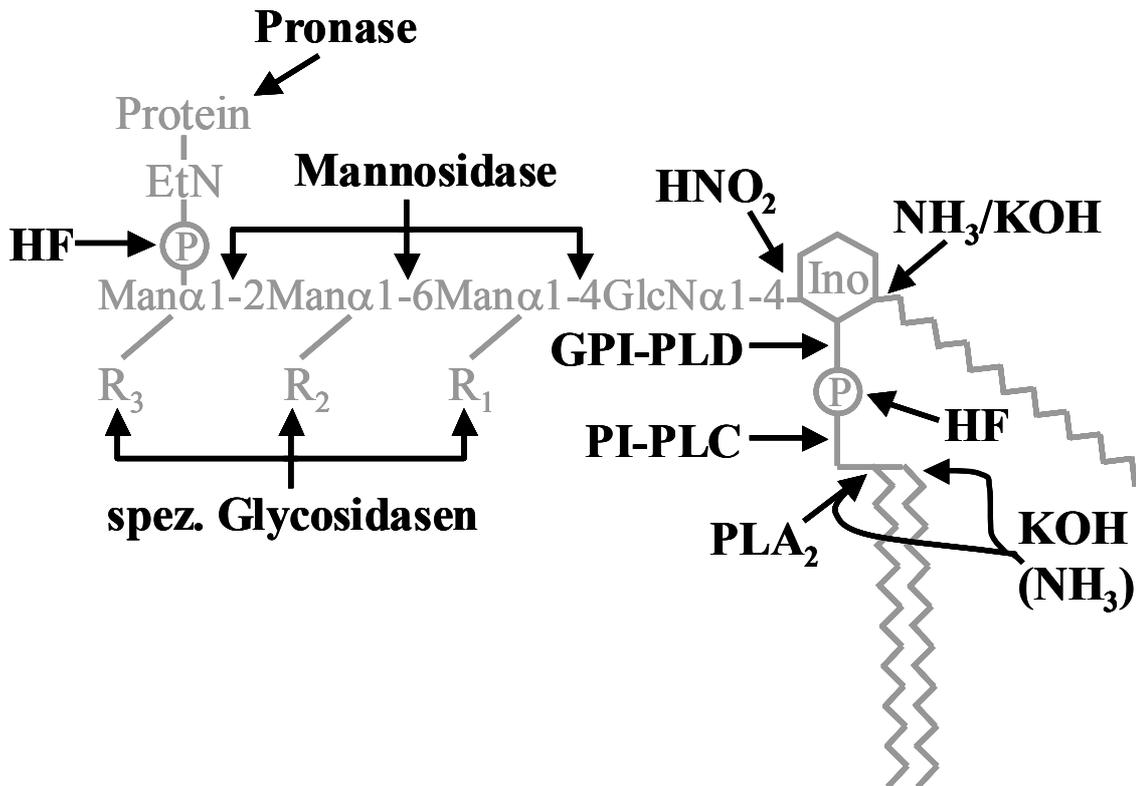


Abb. 6: Schematische Darstellung der potentiellen Spaltstellen eines GPI-Ankers

GPIs werden aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Behandlungen identifiziert und charakterisiert (Spaltungen durch Pfeile angezeigt). Anhand des GPI-Anker-Vorläufers P2 von *T. b. brucei* sind die verschiedenen Spaltstellen eingetragen. HNO_2 : Deaminierung mit salpetriger Säure; HF: Dephosphorylierung mit wässriger Flußsäure; KOH/NH_3 : alkalische Verseifung von Fettsäureestern; GPI-PLD: Glycosyl-Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase D; PI-PLC: Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C; PLA_2 : Phospholipase A₂; EtN: Ethanolamin; P: Phosphodiesterbindung; Man: Mannose; GlcN: Glucosamin; Ino: Inositol; R1, R2, R3: variable Reste 1, 2 und 3; (nach Eckert *et al.*, 1996).

Alle enzymatischen Spaltungen mittels Phospholipasen erfolgen in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 mit 0,1% Desoxycholat. Dieser Puffer wird für die Spaltungen mit PLA_2 und GPI-PLD durch CaCl_2 ergänzt (1 mM bzw. 2,5 mM Endkonzentration). Die Inkubationen erfolgen in der Regel für 3 h bei 37 °C und werden dadurch gestoppt, daß der gesamte Ansatz für etwa 1 min gekocht wird. Anschließend werden die Ansätze zwischen wassergesättigtem 1-Butanol und Wasser verteilt, d. h. die wässrigen Enzymsätze werden zweimal mit dem gleichen Volumen wassergesättigtem 1-Butanol und die vereinigten Butanolphasen mit 1 Volumen Wasser gewaschen. Die Inkubationen werden mit im Glycananteil markierten, freien GPIs durchgeführt. Die Spaltungseffizienz wird bestimmt, indem Aliquots beider Phasen im LSC gemessen werden.

3.14.2 Charakterisierung von GPIs mittels spezifischer Hydrolysen

Die chemischen Spaltungen beinhalten Behandlungen, die GPI-spezifisch sind bzw. Aussagen über Strukturmerkmale von GPIs erlauben. Dazu gehören die Deaminierung mit salpetriger Säure, alkalische und saure Hydrolysen und die Dephosphorylierung mit wässriger Flußsäure.

Spaltung durch salpetrige Säure

Zur Identifizierung von GPIs und zur Freisetzung des Glycananteils dient die Spaltung mit salpetriger Säure (HNO_2). Dabei kommt es unter der intermediären Bildung eines Diazoniumkations ($\text{R-N}^+=\text{N}$) zur Deaminierung des Glucosamins, da Diazoniumsalze von Alkylverbindungen sehr leicht molekularen Stickstoff eliminieren. Es kommt zum Bruch der Bindung zwischen der hierbei entstehenden Anhydromannose und dem Inositol und zur Abspaltung des Glycans vom Lipid. Die Spaltungseffizienz kann nach einer Butanol/Wasser-Verteilung (s. 3.14.2) im LSC bestimmt werden. Weiterhin kann der durch HNO_2 freigesetzte Glycananteil auf einer Bio-Gel P4-Gelfiltrationssäule analysiert werden. Dazu werden etwa 1.700 cpm der Probe und Dextranhydrolysat (ca. 15 mg) als interner Standard (Field und Menon, 1992) auf eine Bio-Gel P4-Säule aufgetragen und mit 0,2 M Ammoniumacetat/0,02% Na-Azid eluiert (s. 3.16).

Bei der Gelfiltrationschromatographie verweilen kleinere Moleküle länger auf der Säule als größere. Moleküle, die größer als die Ausschlußgrenze des verwandten Chromatographiematerials sind, laufen ohne Verzögerung über die Säule (Ausschlußvolumen). Das verwandte Bio-Gel P4-Chromatographiematerial besitzt ein Ausschlußvolumen von 4 kDa und eignet sich daher sehr gut zur Analyse von Oligosacchariden. Der Nachweis des internen Standards erfolgt, indem Aliquots von 25 μl pro Fraktion (ca. 800 μl) in einer Mikrotiterplatte mit 100 μl 0,2% Orcin/konz. Schwefelsäure gemischt werden. Anschließend wird die Mikrotiterplatte für 10 min auf 120 °C erhitzt, um die Sensitivität der Nachweisreaktion zu erhöhen. Die Abschätzung der Elutionsvolumina der einzelnen Glucoseoligomere erfolgt sowohl per Auge als auch in einem ELISA-Reader (Sanofi, Freiburg). Dabei wird die OD bei 450 nm gemessen. Die relativen Elutionsvolumina werden in Glucoseeinheiten (GU) angegeben. Das übrige Material einer jeden Fraktion wird im LSC gemessen.

- salpetrige Säure:
- 1) 0,2 M Natriumacetat, pH 4,0
0,1% (SDS)
 - 2) 0,5 M NaNO_2 (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)

Lsg. 1) und 2) werden direkt vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt.

Alkalische Hydrolysen (Gerold *et al.*, 1994; mod. nach Menon *et al.*, 1990b)

Aussagen über die Struktur des hydrophoben Anteils von GPIs lassen sich durch Analysen der Sensitivität gegenüber alkalischer Verseifung erzielen. Eine Behandlung mit KOH oder NaOH führt unter den unten beschriebenen Bedingungen zur Abspaltung aller estergebundenen Fettsäuren, wogegen ethergebundene Fettsäuren sowie Sphingolipide nicht gespalten werden. Eine mildere alkalische Verseifung mit konzentriertem Ammoniak (32%) führt bei kürzerer Inkubationszeit (in der Regel 30 min) zu einer selektiven Abspaltung der am Inositol gebundenen Palmitinsäureester (Menon *et al.*, 1990b). Sie kann daher eine GPI-Struktur durch Abspalten einer hydrophoben Inositolmodifikation sensitiv gegenüber PI-PLC machen.

Die Analyse der Produkte der alkalischen Hydrolysen erfolgt nach dem Eintrocknen und der Phasenverteilung zwischen wassergesättigtem 1-Butanol und Wasser im LSC bzw. durch DC-Analysen.

KOH-Hydrolyse: (Gerold *et al.*, 1994)

Die getrocknete Probe wird in 100 µl 0,1 M KOH/Methanol (1:1) aufgenommen und für 4 h bei 50 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl Essigsäure gestoppt.

NH₃-Hydrolyse: (mod. nach Menon *et al.*, 1990b)

Die getrocknete Probe wird in 50 µl Methanol aufgenommen. Es werden 50 µl 32%iger NH₃ zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 25 µl Eisessig gestoppt.

Spaltung durch wässrige Flußsäure und Darstellung neutraler Glycane

(Gerold und Schwarz, 2002)

Phosphodiesterbindungen, von denen GPIs mindestens eine zwischen dem hydrophoben Anteil und dem Inositol enthalten, können spezifisch durch wässrige Flußsäure (HF) gespalten werden. Die Probe wird in einem Eppendorfgefäß getrocknet und auf Eis für mindestens 60 h mit 50 µl 48%iger HF inkubiert. Anschließend wird die Probe wie folgt aufgearbeitet: Nach der Inkubation wird die Flußsäure über Stickstoff eingetrocknet. Dann wird die Probe für 3-4 h mit 100 µl HNO₂ deaminiert (s. o.). Die Reaktion wird durch Zugabe von 16,6 µl 0,8 M Borsäure gestoppt und der pH-Wert durch Zugabe von 2 M NaOH auf pH 10-11 eingestellt. Die Reduktion erfolgt mit 60 µl frisch angesetzttem 2 M Natriumborhydrid (NaBH₄) in 0,3 M NaOH für 3-4 h bei Raumtemperatur. Die Reduktion wird durch Zugabe von 3 x 10 µl 50% Essigsäure gestoppt. Danach wird die Probe teilweise entsalzt, indem Kationen (400 µl Kationentauscher AG50W-x12) und anschließend flüchtige Boratmethylester (Probe jeweils zweimal in Methanol/5% HAc, Methanol und Toluol aufnehmen und wieder

trocknen) entfernt werden. Die Probe wird in 200 µl Wasser aufgenommen, über eine Mischbettionentauschersäule (s. u.) vollständig entsalzt und abschließend durch einen 0,2 µm HPLC-Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert. Die Analyse der Probe erfolgt auf einer Dionex "high-pH-anion-exchange-chromatography" (HPAEC)-Anlage (Dionex). Sollte die Probe noch mit unspezifischer Radioaktivität verunreinigt sein, so kann sie über eine Bio-Gel P2-Gelfiltrationssäule (Eluent: Wasser mit 0,02% Natriumazid) gereinigt werden.

Mischbettionentauscher:	Chelex 100 (Na ⁺)	oben
	AG50W-x12 (H ⁺)	↓
	AG3-x4A (OH ⁻)	
	QAE Sephadex (OH ⁻)	unten

Jeweils 200 µl jedes Ionentauschers (alle von der Firma BioRad) werden in ein 1-ml-Säulchen gefüllt, die Säule mit dem dreifachen Volumen Wasser äquilibriert, die Probe aufgetragen und mit dem zweifachen Volumen Wasser eluiert.

3.15 Analyse der intakten Core-Glycane von GPIs

Jeweils etwa 2.000 cpm einer Probe der entsalzten Core-Glycane werden sowohl auf einer PA1-CarboPak-Säule der Dionex-HPAEC-Anlage als auch an Bio-Gel P4-Gelpermeationssäulen analysiert.

Die Dionex-HPAEC ist eine Anionen-Austausch-Chromatographie. Zucker sind teilweise anionisch und liegen in dem stark basischen Eluenten (pH 13), mit dem die HPAEC betrieben wird, partiell ionisch vor. In dieser Form können Zucker an Anionentauschern chromatographiert werden. Obwohl Zucker alkalilabil sind, erfolgt während der kurzen Dauer der Chromatographie keine Destruktion der analysierten Moleküle. Darüber hinaus ermöglicht die Dionex-HPAEC eine sehr spezifische Auftrennung von Mono- bzw. Oligosacchariden, die sogar die Trennung von Anomeren in Oligosacchariden erlaubt (Hardy und Townsend, 1988). Die Gelpermeationschromatographie erfolgt wie unter 3.16 beschrieben, nur werden die neutralen Glycane mit Wasser (0,02% Azid) von der Säule eluiert.

Für beide Analysemethoden dienen Dextranhydrolysate als interne Standards. Der interne Standard wird bei der Gelfiltration durch Oxidation mit Orcin/Schwefelsäure nachgewiesen (s. 3.16). Der Nachweis der internen Standards bei der Dionex-HPAEC erfolgt durch "gepulste amperometrische" Detektion (PAD - pulsed amperometric detection). Dabei wird ein Teil der Probe oxidiert und der Stromfluß gemessen. Das Elutionsvolumen bzw. die Elutionszeit der Radioaktivität in bezug auf den Dextranstandard ergibt eine relative Elutionsposition, die in sogenannten "Dionexseinheiten" (DU) angegeben wird.

Elutionsprogramm für die Analyse von neutralen Glycanen an der HPAEC:

0,0-6,0 min	isokratisch 100 mM NaOH
6,1-36,0 min	auf 75 mM NaOAc/100 mM NaOH
36,1-66,0 min	isokratisch 250 mM NaOAc/100 mM NaOH
66,1-85,0 min	isokratisch 100 mM NaOH
Durchflußrate:	1 ml/min

3.16 Darstellung von Dextranhydrolysat

(Yamashita *et al.*, 1982)

Als interner Standard und zur Kalibrierung der Bio-Gel P4-Chromatographie sowie der Dionex-HPAEC zur Untersuchung der Glycanstruktur von GPIs dient in der Regel partiell hydrolysiertes Dextran. Interne Standards aus Dextranhydrolysat erlauben es, den radioaktiven Proben relative Größen (GU bzw. DU) zuzuordnen. Diese Werte können mit den entsprechenden Werten für Standards bekannter Struktur, z. B. aus *T. b. brucei* oder *P. falciparum*, und publizierten Werten für neutrale Glycane von GPIs anderer Organismen verglichen werden (Ferguson, 1993).

Dextranhydrolysat wird gewonnen, indem 200 mg Dextran (Sigma) in 1 ml 0,1 M HCl gelöst wird und für 2 h bei 100 °C reagiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet und verbliebene HCl durch zweimaliges Eintrocknen mit Methanol entfernt. Das partiell hydrolysierte Dextran wird zum Gebrauch als Standard für Bio-Gel P4-Säulen mit 1 Volumen Serdolit-MB3-Ionentauscher versetzt. Das derart entsalzte Dextran wird getrocknet und in Wasser gelöst, so daß eine Lösung von 100 mg/ml entsteht. Etwa 150 µl dieser Dextranlösung werden mit der radioaktiven Probe versetzt und an Bio-Gel P4 chromatographiert. Der interne Standard wird nachgewiesen, indem jeweils 25 µl einer Fraktion mit 100 µl 0,2% Orcin/konz. H₂SO₄ versetzt und für 10 min bei 100 °C inkubiert werden (Gerold *et al.*, 1994). Die oxidierten Zucker färben sich dunkelbraun. Die Intensität der Färbung erlaubt eine Abschätzung, in welchen Fraktionen die Maxima der verschiedenen Glucoseoligomere eluieren. Die Abschätzung erfolgt sowohl nach Augenschein als auch aufgrund der OD bei 450 nm. Die für die beschriebenen Analysen eingesetzten Bio-Gel P4 (>400 mesh)-Säulen (130 cm x 1 cm) trennen im Bereich von 1-14 Glucoseeinheiten. Dies entspricht einem Molekulargewichtsbereich von 200-3.000 Dalton.

Dextranhydrolysat wird für den Gebrauch auf der Dionex-HPAEC 1:1.000 verdünnt, über einen Mischbettionentauscher (s. 3.14.2) entsalzt und mehrfach filtriert. Etwa 5 µl Dextranhydrolysat werden zusammen mit der radioaktiven Probe injiziert (Gerold *et al.*, 1994). Die Detektion des Dextranhydrolysates erfolgt durch "gepulste amperometrische" Messung (s. o.).

4 Ergebnisse

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es nur wenige Erkenntnisse zur Topologie der Biosynthese von GPI-Ankern in eukaryontischen Zellen. Lediglich für frühe Biosyntheseintermediate konnte in Trypanosomen und einer Mauszelllinie gezeigt werden, daß diese überwiegend auf der cytoplasmatischen Seite des ER vorhanden sind (Vidugiriene und Menon, 1993; 1994). Es wurde daher ein System permeabilisierter Zellen etabliert, das Untersuchungen auch an höher glycosylierten und an der Zuckerseitenkette modifizierter GPI-Anker-Biosyntheseintermediate erlaubt. Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils werden die Etablierung dieses Systems zur Permeabilisierung von *T. gondii*-Tachyzoiten und die Kontrollen zur Prüfung des entwickelten Systems beschrieben. In Abschnitt 2 sind Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Glycolipiden aus *T. gondii* dargestellt. Hier wird die Übereinstimmung der unter den angewandten Bedingungen synthetisierten Glycolipide mit den beschriebenen Strukturen (Striepen *et al.*, 1997; Zinecker *et al.*, 2001) geprüft. In Abschnitt 3 werden schließlich die Untersuchungen zur Topologie der GPI-Anker-Biosynthese in subzellulären Membranen von *T. gondii* beschrieben.

4.1 Etablierung eines Systems zur Permeabilisierung von *T. gondii*-Tachyzoiten

Mit *T. gondii* infizierte Zellkulturen wurden mit [³⁵S]Methionin metabolisch markiert. Die Parasiten wurden aus den Wirtszellen freigesetzt, gewaschen und gezählt. Resuspendiert wurden die Toxoplasmen mit DMEM + Proteaseinhibitoren (s. u.) zu einer Konzentration von 2×10^8 PE/ml. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit Streptolysin O, ein anderer Teil mit Saponin behandelt.

4.1.1 Behandlung mit Streptolysin O (mod. nach Bhakdi *et al.*, 1993) permeabilisiert *T. gondii* nicht

Jeweils 1×10^7 Parasiten wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Streptolysin O behandelt (0,14 µg/µl bzw. 0,29 µg/µl; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Bhakdi, Mainz). Nach der Permeabilisierung (5 min auf Eis, dann 5 min 37 °C) wurden die Parasiten zentrifugiert (1.500 x g, 5 min, 4 °C), in DMEM + Proteaseinhibitoren (0,1 mM TLCK, 1 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Aliquots der Überstände und des resuspendierten Sediments wurden im Szintillationszähler analysiert und die prozentuale Verteilung der Radioaktivität zwischen Überstand und Sediment (Überstand + Sediment = 100%) graphisch dargestellt (Abbildung 7). Bei beiden eingesetzten Streptolysin O-Konzentrationen konnte nur ein geringer Teil der markierten Proteine in den Überstand freigesetzt werden. Der größte Teil der Radioaktivität (90%) blieb im Sediment zurück.

Die Behandlung von Toxoplasmen mit Streptolysin O nach diesem Verfahren scheint daher nicht geeignet zu sein, um die Zellen effektiv zu permeabilisieren.

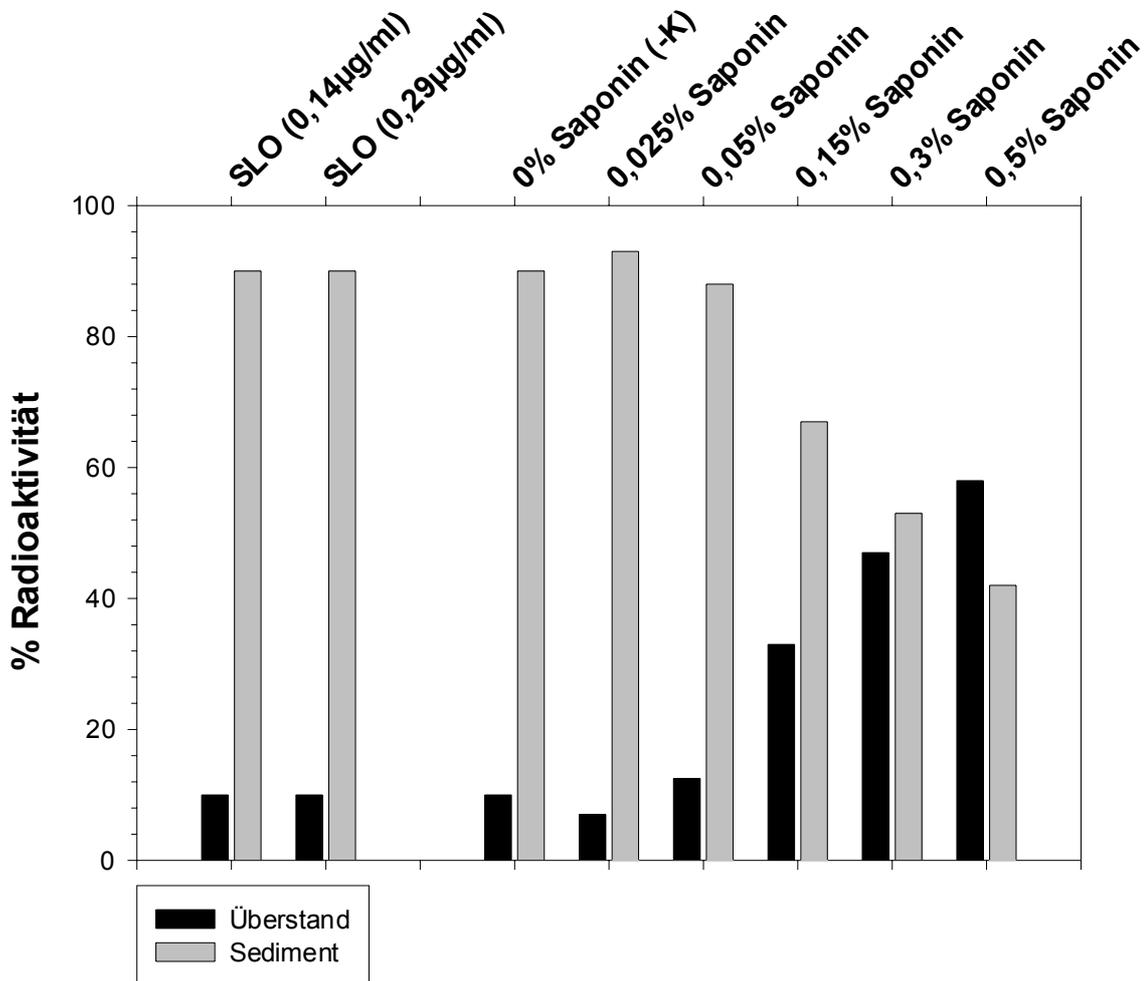


Abb. 7: Freisetzung von [³⁵S]Methionin-markierten *T. gondii*-Proteinen nach unterschiedlichen Behandlungen zur Permeabilisierung der Zellmembran

Proteine von *T. gondii* wurden mit [³⁵S]Methionin metabolisch markiert. Die Parasiten wurden aus den Wirtszellen freigesetzt und gewaschen, und anschließend unterschiedlichen Behandlungen zur Permeabilisierung der Zellen unterzogen. Zwei Proben wurden mit Streptolysin O (SLO) behandelt, weitere sechs Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen von Saponin (0-0,5%). Die behandelten Parasiten wurden zentrifugiert und gewaschen, die Überstände vereinigt und das Sediment resuspendiert. Aliquots von Überstand und Sediment wurden im Szintillationszähler gemessen und die prozentuale Verteilung zwischen Überstand und Sediment dargestellt (Überstand + Sediment = 100%). Durch die Behandlung mit Streptolysin O konnte nur ein sehr geringer Anteil intrazellulärer Proteine in den Überstand freigesetzt werden. Bei der Behandlung mit 0,05% Saponin konnten noch keine nennenswerten Mengen Protein in den Überstand freigesetzt werden, ab einer Konzentration von 0,15% Saponin ist ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge im Überstand nachzuweisen. -K = Negativkontrolle; SLO = Streptolysin O.

4.1.2 Behandlung mit Saponin zerstört die Zellstruktur

Jeweils 1×10^7 Parasiten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Saponin behandelt (0-0,5% Saponin). Nach der Behandlung (5 min auf Eis) wurden die Parasiten zentrifugiert (1.500 x g, 5 min, 4 °C), in DMEM + Proteaseinhibitoren (0,1 mM TLCK, 1 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Aliquots der Überstände und des resuspendierten Sediments wurden im Szintillationszähler analysiert und die prozentuale Verteilung der Radioaktivität zwischen Überstand und Sediment (Überstand + Sediment = 100%) graphisch dargestellt (Abbildung 7). Bis zu einer Konzentration von 0,05% Saponin werden nur sehr geringe Mengen an Protein, die im Bereich der Negativkontrolle liegen, in den Überstand freigesetzt. Ab einer Konzentration von 0,15% Saponin ist ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge im Überstand nachzuweisen (33%), der bei 0,5% Saponin auf 58% steigt. Um die Größenverteilung der freigesetzten Proteine zu überprüfen, wurden zwei 10%ige SDS-Polyacrylamidgele (nach Laemmli *et al.*, 1970; in Gelkammern der Firma Höfer, ca. 16x16 cm) angefertigt und Aliquots von Überstand und Sediment nach Saponinbehandlung aufgetragen. Für das eine Gel wurde ein Wide Range-Marker (Sigma, Steinheim) verwendet, für das andere wurde ein radioaktiv markierter Marker mit [¹⁴C]Methylierten Proteinen (Amersham, Braunschweig) verwendet und die Proteine anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine des einen Gels wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht und das Gel anschließend getrocknet (Abbildung 8 A). Das radioaktiv markierte Gel wurde getrocknet und mittels Bio-Imager (Fujifilm, Raytest, Straubenhardt) analysiert (Abbildung 8 B). Bei beiden Methoden ist zu erkennen, daß bis zu einer Konzentration von 0,05% Saponin nur sehr geringe Mengen an Proteinen in den Überstand gelangt sind. Ab einer Konzentration von 0,15% Saponin sind dann deutliche Mengen an Protein im Überstand nachweisbar. Die Größe der freigesetzten Proteine verteilt sich über den gesamten Molekulargewichtsbereich. Eine deutliche Proteinbande im Überstand hat ein Molekulargewicht von ca. 160 kDa, aber auch deutlich größere Proteine sind im Überstand nachweisbar. Der Bereich zwischen 0,05% und 0,3% Saponin könnte daher geeignet sein, um Toxoplasmen effektiv zu permeabilisieren. Die Größe der freigesetzten Proteine läßt jedoch darauf schließen, daß die Zellstruktur der Parasiten zerstört wird. Daher wurden nicht-radioaktiv markierte Toxoplasmen erneut mit unterschiedlichen Konzentrationen Saponin behandelt und anschließend die Zellzahl mit einer nichtbehandelten Kontrolle verglichen. Bei einer Konzentration von 0,15% Saponin sind ca. 20% weniger Zellen zählbar, bei einer Konzentration von 0,3% Saponin bereits ca. 50% weniger.

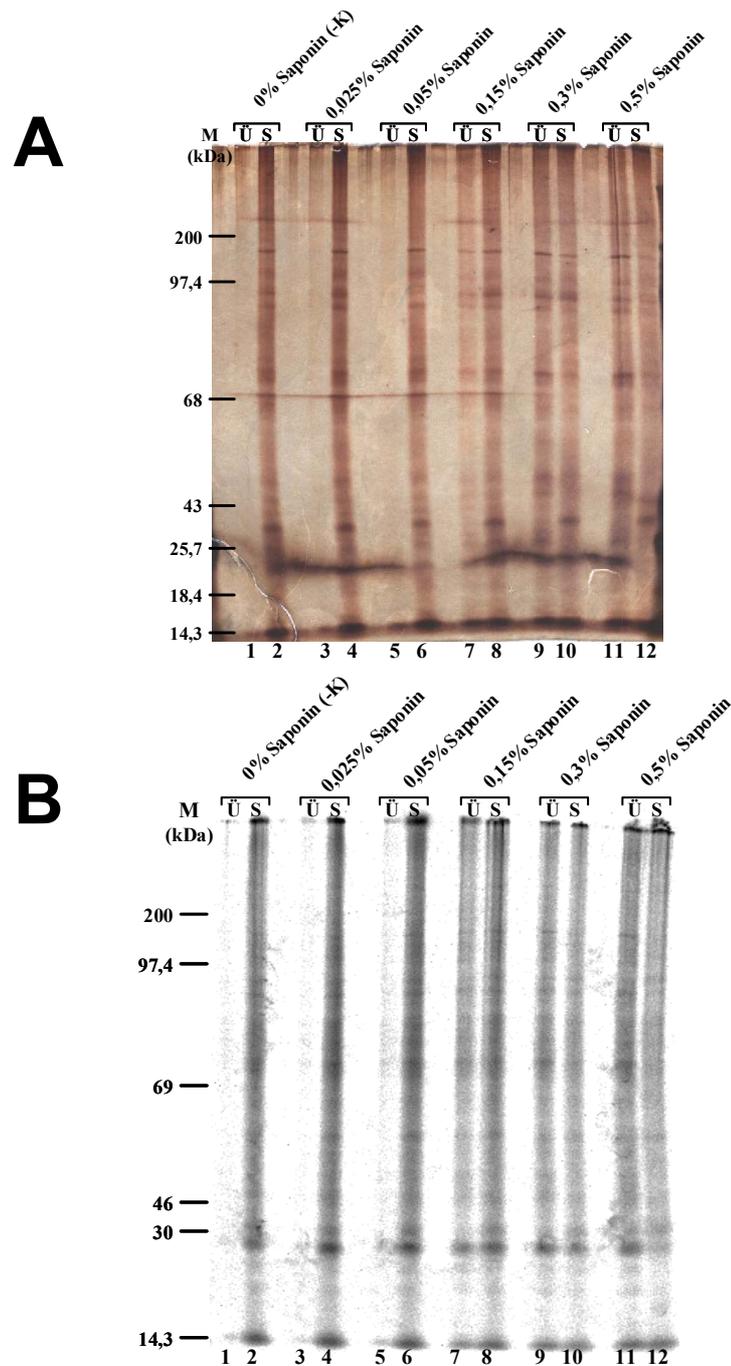


Abb. 8: Größenverteilung freigesetzter *T. gondii*-Proteine nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Saponin

Proteine von *T. gondii* wurden metabolisch mit [³⁵S]Methionin radioaktiv markiert. Die Parasiten wurden aus den Wirtszellen freigesetzt und gewaschen, und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen von Saponin (0-0,5%) behandelt. Die behandelten Parasiten wurden zentrifugiert und gewaschen, die Überstände vereinigt und das Sediment resuspendiert. Aliquots von Überstand (Ü) und Sediment (S) wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Ein Gel wurde silbergefärbt (A), bei dem anderen wurde die Radioaktivität mittels Bio-Imager detektiert (B). Bei der Behandlung mit bis zu 0,05% Saponin konnten nur geringe Mengen Protein in den Überstand freigesetzt werden, ab einer Konzentration von 0,15% Saponin ist ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge im Überstand nachzuweisen. Es wurden Proteine mit einer Größe von deutlich über 200 kDa freigesetzt. M = Molekulargewichtsmarker; -K = Negativkontrolle.

4.1.3 GDP-[³H]Man-markierte Glycolipide lassen sich in Streptolysin O-behandelten Parasiten *nicht* mit PI-PLC spalten (mod. nach Chaturvedi *et al.*, 1999)

Da die Permeabilisierung mit Streptolysin O nach Bhakdi *et al.*, 1993 nicht erfolgreich war, wurde Streptolysin O aus einer anderen Quelle getestet (Murex Diagnostic, Dartford, UK). Zunächst wurde die Aktivität des Streptolysin O bestimmt. Von dem frisch gelösten Streptolysin O wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und 5 µl jeder Verdünnungsstufe mit 50 µl Humanerythrocyten (2,5%; v/v) 40 min bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der totalen Hämolyse wurden Erythrocyten in 0,2% SDS inkubiert, die Negativkontrolle wurde nur mit Kaliumacetat-Puffer inkubiert, der zum Lösen des Streptolysin O verwendet wurde. Nach Zentrifugation wurden jeweils 30 µl Überstand in 1 ml A. bidest gegeben und die Extinktion photometrisch bestimmt. Der Prozentsatz der Hämolyse (0,2% SDS entspr. 100% Hämolyse; Puffer entspr. 0% Hämolyse) wurde gegen die Verdünnung graphisch dargestellt und mit Hilfe eines

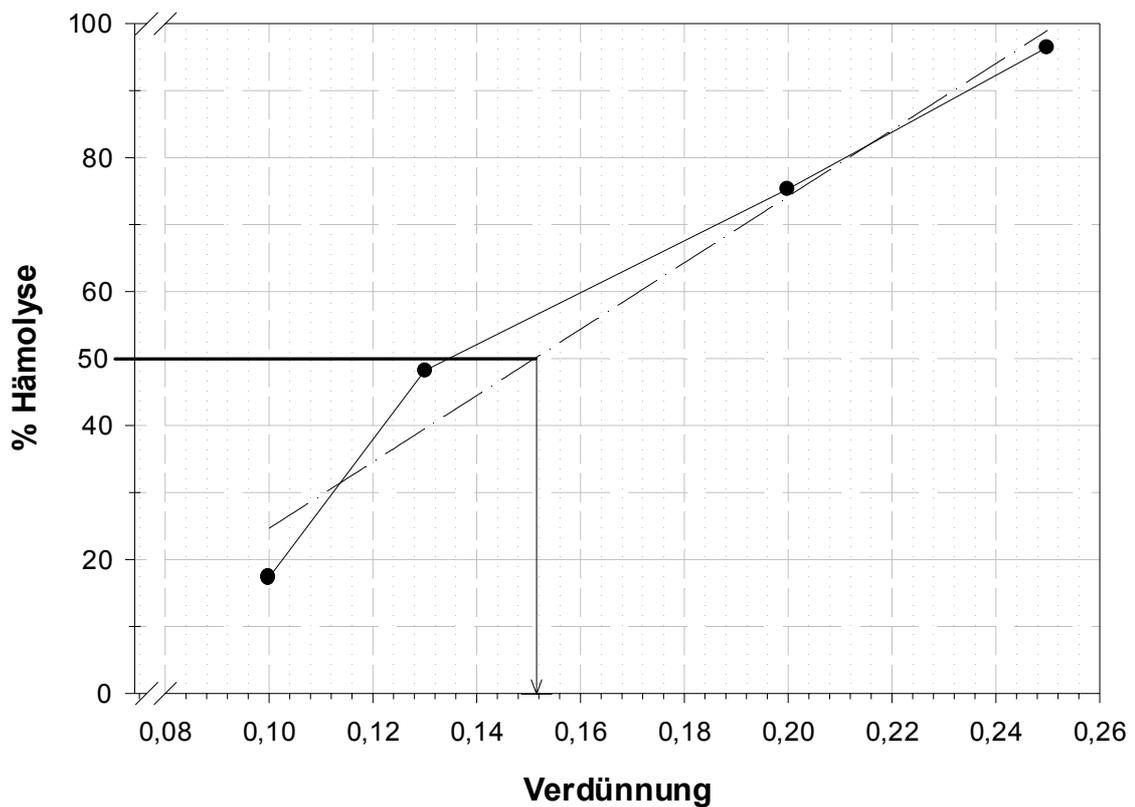


Abb. 9: Bestimmung der Streptolysin O-Aktivität

Verschiedene Verdünnungsstufen einer Verdünnungsreihe von Streptolysin O wurden zusammen mit einer Suspension aus Humanerythrocyten inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in A. bidest verdünnt und die Extinktion bei $\lambda = 412$ nm gemessen. Dargestellt ist die erzielte Hämolyse [%] in Abhängigkeit von der verwendeten Streptolysin O-Verdünnungsstufe. Totale Hämolyse bei 0,2% SDS im Ansatz = 100%, Negativkontrolle (Inkubation mit Kaliumacetat-Puffer) = 0%. Die Aktivität des Streptolysin O in I.U./ml ergibt sich aus dem Reziproken der Verdünnung bei 50% Hämolyse, abgelesen an einer computererstellten Regressionsgeraden. Danach ergibt sich eine Streptolysin O-Aktivität von 6,6 I.U./ml.

Computerprogramms (SigmaPlot) eine lineare Regression berechnet (Abbildung 9). Die Aktivität des Streptolysin O in I.U./ml ergibt sich aus dem Reziproken der Verdünnung bei 50% Hämolyse:

$$\text{Aktivität [I.U./ml]} = \frac{1}{0,151} = 6,62 \text{ I.U./ml}$$

Die angesetzte Streptolysin O-Lösung hat eine Aktivität von 6,6 I.U./ml. Für die folgenden Versuche wurde sie auf 4 U/ml eingestellt und bis zu ihrer Verwendung in Aliquots von 100 µl bei -80 °C gelagert.

Zur Permeabilisierung von *T. gondii*-Tachyzoiten wurden diese aus ihren Wirtszellen freigesetzt, gereinigt und Aliquots von 1×10^8 PE mit Streptolysin O (1 U/ml) behandelt. Die Permeabilisierung wurde mittels Trypan Blau-Färbung geprüft. Nach Streptolysin O-Behandlung waren ca. 45% der Toxoplasmen angefärbt, ohne Behandlung ca. 20%. Nach erneutem Waschen, um das Streptolysin O zu entfernen, wurden die Parasiten mit 2 µCi GDP-[³H]Man pro Ansatz für 2 h bei 37 °C radioaktiv markiert. Die Markierung wurde durch Transfer der Ansätze auf Eis beendet und die Parasiten anschließend mit 6 U/ml PI-PLC aus *B. thuringiensis* (rekombinant in *B. subtilis*) behandelt. Dieses Enzym ist besonders gut geeignet, um membranverankerte GPIs zu spalten (Low, 1989; 1992; Menon, 1994), sofern sie nicht am Inositol durch eine zusätzliche Fettsäure modifiziert sind. Der Negativkontrolle wurde statt PI-PLC die entsprechende Menge PI-PLC-Aufbewahrungspuffer (25 mM Tris-Acetat; pH 7,4; 50% Glycerin) zugesetzt. Um zu überprüfen, ob nach Zerstörung der Membranstrukturen von *T. gondii* markierte Glycolipide gespalten werden können, wurden weitere Kontrollansätze in Gegenwart von 0,1% Desoxycholat (DOC) mit PI-PLC behandelt. Die ungespaltenen Glycolipide wurden anschließend mit C/M/W extrahiert und mittels Phasenverteilung zwischen 1-Butanol und Wasser gereinigt. Aliquots der einzelnen Ansätze wurden mittels Szintillationszähler analysiert (Tabelle 1). Nach Behandlung mit PI-PLC konnten die gleichen Mengen an Glycolipiden extrahiert werden, wie in der unbehandelten Kontrolle. Das bedeutet, daß durch die Behandlung mit PI-PLC keine Glycolipide gespalten werden konnten. Nachdem jedoch die Membranstruktur durch Zugabe eines Detergenz zerstört wurde, konnte nur ein Anteil von 32%, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, extrahiert werden. Das Enzym hat also erst nach Auflösung der Membranstruktur Zugang zu den radioaktiv markierten Glycolipiden, was zwei Ursachen haben kann: Die Glycolipide sind auf der luminalen Seite des ER vor dem Enzymverdau geschützt oder die Parasiten sind nicht ausreichend permeabilisiert, d. h. PI-PLC gelangt nicht durch die Zellmembran an die cytoplasmatische Seite des ER.

Tab. 1: PI-PLC-Behandlung nach GDP-[³H]Man-Markierung von Streptolysin O-behandelten Parasiten

T. gondii-Parasiten wurden mit Streptolysin O behandelt, mit GDP-[³H]Man für 2 h bei 37 °C radioaktiv markiert und anschließend 30 min auf Eis mit PI-PLC behandelt. Die Glycolipide wurden extrahiert und ein Aliquot jeder Probe im Szintillationszähler gemessen. Die Negativkontrolle wurde nur mit PI-PLC-Puffer (ohne Enzym) versetzt, bei der Positivkontrolle wurde die PI-PLC-Behandlung in Anwesenheit von 0,1% Desoxycholat (+ PI-PLC / + DOC) durchgeführt, um die Membranstruktur zu zerstören. Durch die Behandlung mit PI-PLC können keine Glycolipide gespalten werden. Erst nachdem die Membranstruktur durch Zugabe von 0,1% DOC zerstört wird, läßt sich ein signifikanter Anteil der Glycolipide (68%) spalten. Angaben in cpm.

Behandlung	Radioaktivität [cpm]
- PI-PLC	263.000 ± 34.800
+ PI-PLC	265.000 ± 41.000
+ PI-PLC / + DOC	85.000 ± 17.700

4.1.4 Hypoton permeabilisierte, nicht aber Streptolysin O-behandelte *T. gondii*-Zellen lassen sich effektiv durch radioaktive Nukleotidzucker markieren

Aus den Wirtszellen freigesetzte und gereinigte *T. gondii*-Parasiten wurden mit Streptolysin O behandelt, bzw. analog zum sogenannten zellfreien System (mod. nach Masterson *et al.*, 1989; Striepen *et al.*, 1997) hypoton behandelt. Ein Teil des Parasitenmaterials blieb zur Kontrolle unbehandelt. Aliquots von 5 x 10⁷ PE pro Ansatz wurden mit verschiedenen Nukleotidzuckern (UDP-[³H]GlcNAc, GDP-[³H]Man und UDP-[³H]GalNAc) für 2 h bei 37 °C radioaktiv markiert. Ein zusätzlicher Ansatz der UDP-[³H]GlcNAc-Markierung wurde in Anwesenheit von 0,1% Desoxycholat durchgeführt. Anschließend wurden die Glycolipide mit C/M/W extrahiert, mittels Phasenverteilung zwischen 1-Butanol und Wasser gereinigt und Aliquots der glycolipid-haltigen Butanolphase im Szintillationszähler gemessen (Abbildung 10). Bereits bei unbehandelten, intakten Toxoplasmen können Glycolipide deutlich markiert werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß bereits durch den Prozeß der Aufarbeitung ein Teil der Zellen geschädigt ist und somit die Nukleotidzucker schnell und einfach an den Ort der Biosynthese gelangen können. Eine Behandlung mit Streptolysin O brachte allerdings keine deutliche Steigerung der Markierungseffizienz. Bei der Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc gab es eine Steigerung des Einbaus von Radioaktivität in Glycolipide von 17%, bei der Markierung mit GDP-[³H]Man gab es eine Steigerung von 32% und bei der Markierung mit UDP-[³H]GalNAc gar einen Rückgang von 20%. Wurden die Parasiten jedoch mit einem hypotonen Puffer behandelt, so gab es eine deutliche Steigerung der Markierungseffizienz: Bei der Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc gab es eine Steigerung um das 2,6fache, bei der Markierung mit GDP-[³H]Man um das 4,2fache und bei der UDP-[³H]GalNAc-Markierung eine Steigerung um das 1,4fache gegenüber der Markierung intakter Zellen.

Dies ist ein deutliches Zeichen dafür, daß erst nach hypotoner Permeabilisierung die Zellmembran von radioaktiven Nukleotidzuckern effektiv passiert werden kann und somit eine effektive Markierung möglich ist. Im Gegensatz dazu ist diese Barriere nach der Behandlung mit Streptolysin O gegenüber intakten *T. gondii*-Zellen scheinbar nur unwesentlich beeinflusst. Im nächsten Schritt sollte daher die Beschaffenheit der Parasitenzelle nach hypotoner Behandlung eingehender untersucht werden, da dieses System voraussichtlich den geforderten Bedingungen nach permeabilisierter Zellmembran und intaktem ER entspricht.

Eine Kontrollmarkierung hypoton permeabilisierter Parasiten in Anwesenheit von 0,1% Desoxycholat brachte keinen Einbau von UDP-[³H]GlcNAc in *T. gondii*-Glycolipide. Durch die Zerstörung der Membranstruktur durch ein Detergenz wird offenbar ein für die ersten Biosyntheseschritte wichtiger Enzymkomplex zerstört und ist nicht mehr funktionell.

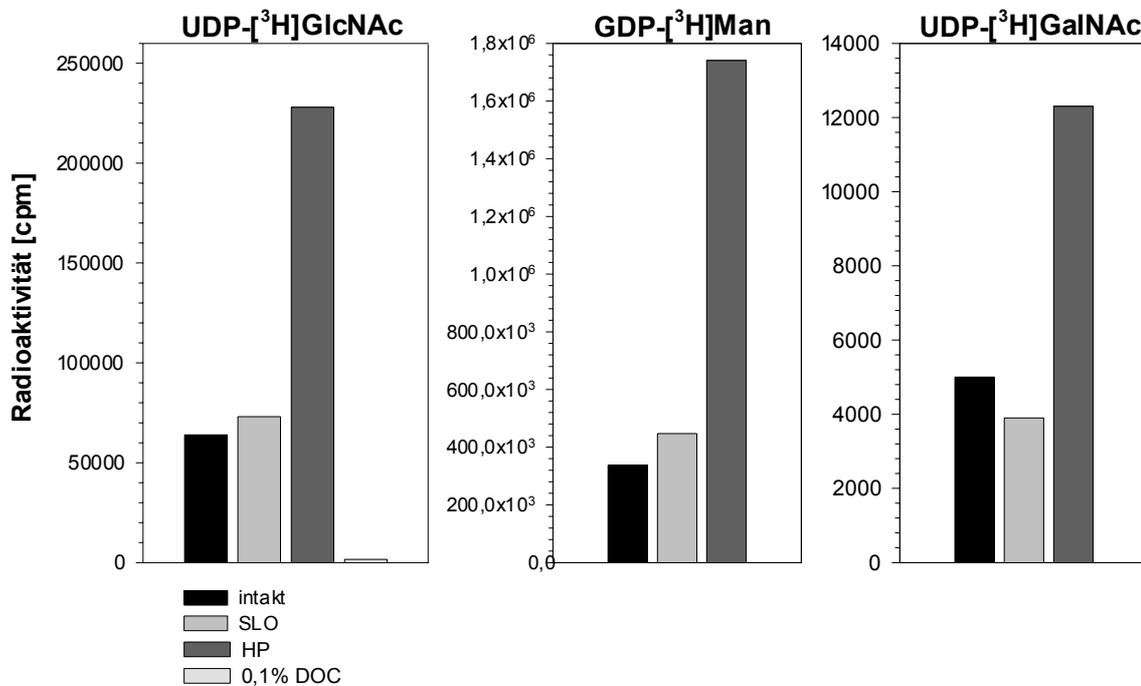


Abb. 10: Markierungseffizienz unterschiedlich behandelter *T. gondii*-Präparationen mit verschiedenen radioaktiven Nukleotidzuckern

Intakte, mit Streptolysin O (SLO) behandelte und hypoton permeabilisierte (HP) Parasiten wurden mit unterschiedlichen radioaktiven Nukleotidzuckern für 2 h bei 37 °C markiert, die Glycolipide extrahiert und ein Aliquot jeden Ansatzes im Szintillationszähler gemessen. Zusätzlich wurde bei der Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc eine Kontrollmarkierung in Anwesenheit von 0,1% Desoxycholat (HP + DOC) durchgeführt. Die Markierungseffizienz wird durch die Behandlung mit Streptolysin O gegenüber intakten Toxoplasmen nicht wesentlich erhöht (UDP-[³H]GlcNAc + 17%, GDP-[³H]Man + 32%), bei Markierung mit UDP-[³H]GalNAc sogar um 20% verringert. Die Markierungseffizienz bei hypoton permeabilisierten Parasiten ist dagegen drastisch erhöht (bis um das 4,2fache bei Markierung mit GDP-[³H]Man). In Anwesenheit von 0,1% Desoxycholat ist keine radioaktive Markierung möglich. Angaben in cpm.

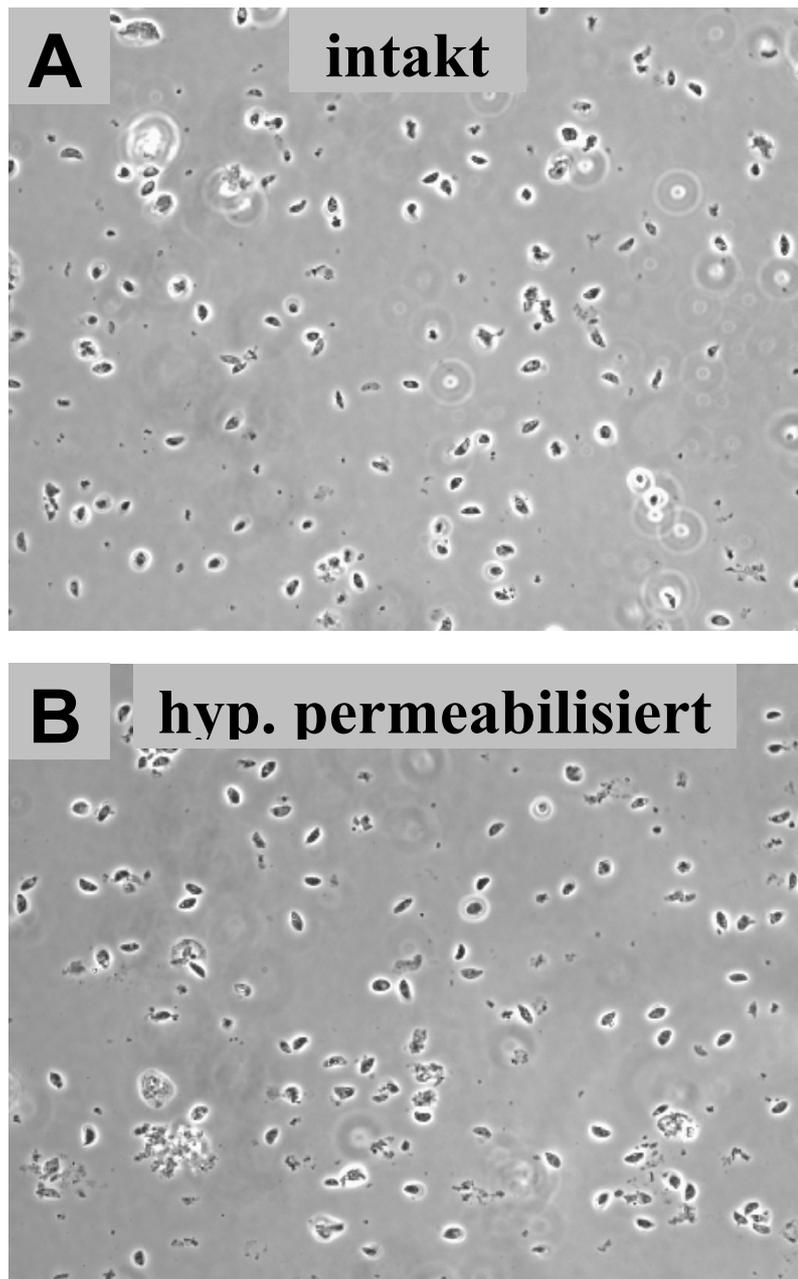


Abb. 11: Phasenkontrastaufnahmen von intakten und hypoton permeabilisierten Toxoplasmen

Toxoplasmen wurden aus den Wirtszellen freigesetzt und gereinigt, ein Teil des Materials anschließend hypoton permeabilisiert. Die intakten (A) und hypoton permeabilisierten (B) Parasiten wurden dann im Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Nach hypotoner Permeabilisierung ist bei 400facher Vergrößerung kein Unterschied zu den intakten Parasiten erkennbar.

4.1.5 Hypoton permeabilisierte Toxoplasmen behalten ihre Zellmembran

Toxoplasmen wurden aus ihren Wirtszellen freigesetzt und gewaschen. Ein Teil des Materials wurde in hypotonem Lysispuffer aufgenommen (1×10^9 PE/ml), anschließend in einem Homogenisator nach Dounce homogenisiert und nochmals gewaschen. Aliquots der beiden Präparationen wurden im Phasenkontrastmikroskop bei 400facher Vergrößerung verglichen. Zwischen intakten und hypoton permeabilisierten Parasiten ist kein Unterschied erkennbar (Abb. 11). Die Parasitenzellen behalten offenbar durch den komplexen und mehrschichtigen Aufbau ihrer Zellmembran selbst nach Permeabilisierung mit Wasser ihre typische äußere Form.

4.1.6 Permeabilisierte Toxoplasmen haben eine intakte GPI-Biosynthese

Um zu untersuchen, ob für die GPI-Biosynthese essentielle lösliche Faktoren durch Permeabilisierung und anschließendes Zentrifugieren verloren gehen, wurden permeabilisierte Parasiten verschiedenen Zentrifugationsschritten unterzogen. Freigesetzte und gewaschene Toxoplasmen wurden hypoton permeabilisiert. Diese Präparation wurde zunächst bei $1.000 \times g$ (10 min, 4°C) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und bei $10.000 \times g$ (10 min, 4°C) zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde ebenfalls vorsichtig abgenommen, abschließend bei $100.000 \times g$ (30 min, 4°C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die drei dabei entstandenen Sedimente wurden im Ausgangsvolumen mit Inkubationspuffer auf 1×10^8 PE/ml resuspendiert und parallel zu dem verbliebenen Überstand für 2 h bei 37°C mit GDP- $[\text{}^3\text{H}]\text{Man}$ radioaktiv markiert. Die Glycolipide wurden extrahiert und mittels Phasenverteilung zwischen 1-Butanol und Wasser gereinigt. Der Einbau von Radioaktivität in Glycolipide wurde im Szintillationszähler bestimmt. Die gesamte eingebaute Radioaktivität aus allen Präparationen wurde auf 100% gesetzt und die Anteile der einzelnen Zentrifugationsschritte graphisch dargestellt (Abbildung 12 A).

Mit dem Sediment der $1.000 \times g$ -Zentrifugation wurden ca. 92% der insgesamt extrahierbaren Glycolipide gebildet, mit dem $10.000 \times g$ Sediment nur noch ca. 4% und mit den $100.000 \times g$ -Präparationen (Sediment und Überstand) noch jeweils ca. 2%.

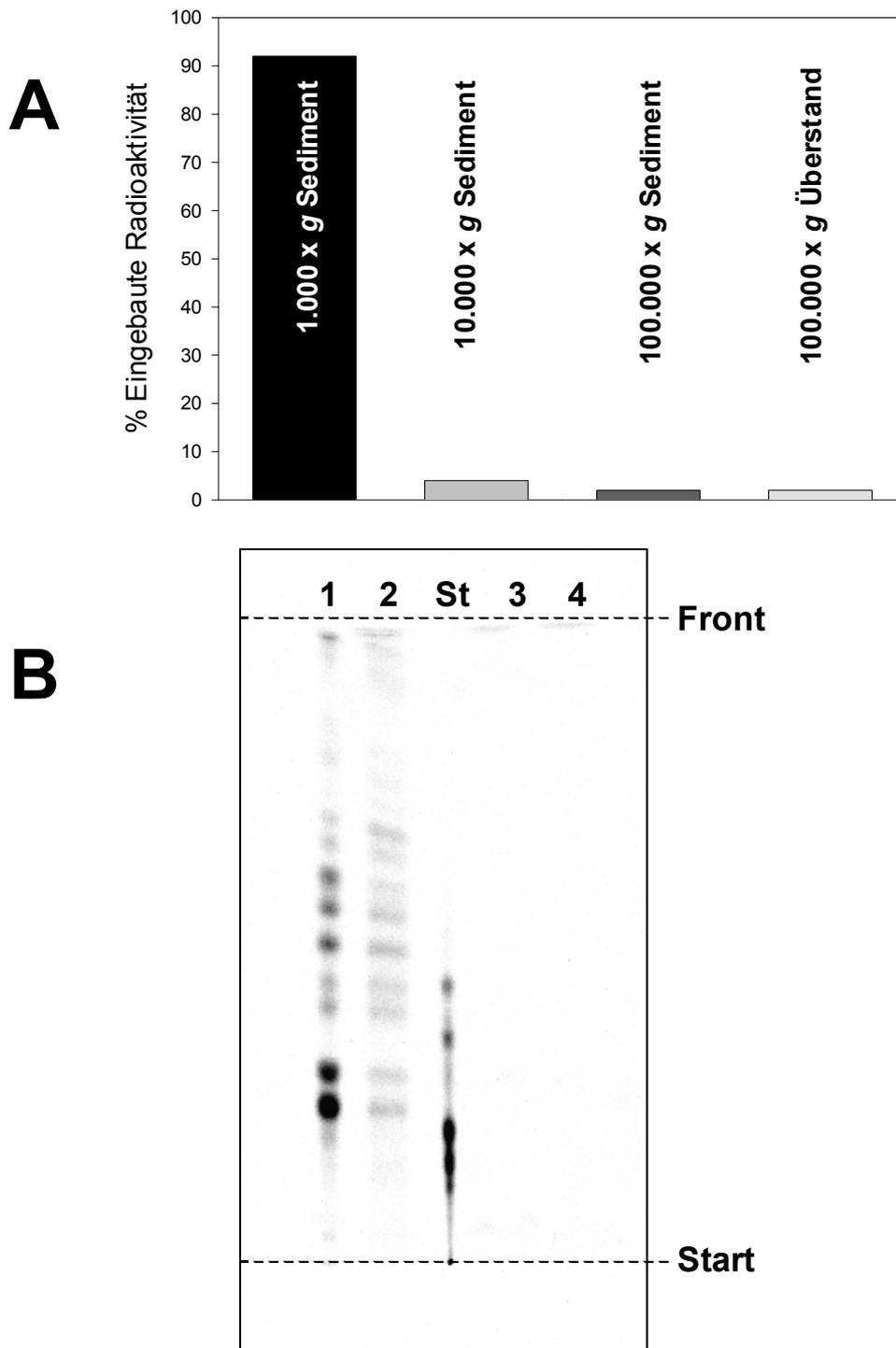


Abb. 12: Markierungseffizienz verschiedener Präparationen von *T. gondii*

Freie Toxoplasmen wurden hypoton permeabilisiert und anschließend sequentiell zentrifugiert: Die Parasiten wurden zunächst bei 1.000 x g (10 min, 4 °C) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei 10.000 x g (10 min, 4 °C) zentrifugiert und der dabei entstandene Überstand bei 100.000 x g (30 min, 4 °C) zentrifugiert. Die Sedimente wurden resuspendiert und parallel zu dem verbliebenen Überstand mit GDP-[³H]Mannose radioaktiv markiert. Die Glycolipide wurden extrahiert und die eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. **A:** Graphische Darstellung der Radioaktivitätsverteilung; alle Ansätze zusammen = 100%. **B:** Aliquots der Ansätze wurden mittels DC analysiert (Laufmittelsystem B). Der größte Teil der synthetisierten Glycolipide (mehr als 90%) wird durch das 1.000 x g Sediment gebildet. St = Standard.

Aliquots der Extrakte 1–4 wurden außerdem dünn-schichtchromatographisch analysiert. Dazu wurde $1/50$ jeder Probe auf Silika 60-Platten (Merk, Darmstadt) aufgetragen und in Laufmittelsystem B (n-Hex/C/M/W/HAc; 3:10:10:2:1) entwickelt. Die Dünnschichtplatte wurde zunächst auf einem DC-Plattenscanner (Berthold, Wildbad) analysiert und dann mit Hilfe eines Bio-Imagers (Raytest, Straubenhardt) zusätzlich ein zweidimensionales Bild der von den einzelnen Präparationen synthetisierten Glycolipide angefertigt (Abbildung 12 B). Auch hier ist deutlich erkennbar, daß die Hauptmenge der radioaktiv markierten Glycolipide von dem 1.000 x g-Sediment gebildet wird (Abb. 12 B, Spur 1). Von dem bei 10.000 x g-sedimentierbaren Material wird zwar noch das gesamte Spektrum an GDP-[^3H]Man-markierbaren Glycolipiden gebildet, aber nur noch in sehr geringen Mengen (Abb. 12 B, Spur 2). Von den beiden Präparationen nach 100.000 x g-Zentrifugation konnte nur noch ein sehr hydrophobes Produkt gebildet werden, andere Intermediate waren nicht mehr erkennbar (Abb. 12 B, Spur 3 und 4). Bei diesem Produkt handelt es sich vermutlich um Dolichol-Phosphatmannose. Dieses Experiment zeigt zum einen, daß die Toxoplasmen durch die Behandlung mit hypotonem Puffer und anschließendem Homogenisieren nicht fragmentiert werden, da fast das gesamte Material bei 1.000 x g sedimentierbar ist. Zum anderen werden durch die Permeabilisierung und anschließendes Waschen keine löslichen Komponenten entfernt, die für eine Markierung mit GDP-[^3H]Man essentiell sind. Die auffällige Abweichung der markierten Glycolipide zum verwendeten Standard wird in Abschnitt 4.2.1 behandelt.

4.1.7 Cytoplasmatische Proteine werden nach hypotoner Permeabilisierung freigesetzt

Um zu überprüfen, ob die Parasitenzellen durch die Behandlung mit hypotonem Puffer tatsächlich permeabilisiert werden, wurde ein stabil mit dem *lacZ*-Gen transfizierter *T. gondii*-Stamm verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Frank Seeber, Marburg). Dieser Stamm ist in der Lage, β -Galactosidase als cytoplasmatisches Protein (ca. 75 kDa) zu exprimieren. Werden diese Zellen permeabilisiert, gelangt die β -Galactosidase nach Zentrifugation in den Überstand und kann dort durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Sind die Zellen nicht permeabilisiert, verbleibt die β -Galactosidase nach Zentrifugation im Sediment und kann dort nachgewiesen werden. Extrazelluläre RH β -1 Toxoplasmen wurden wie beschrieben hypoton permeabilisiert. Duplikate zweier verschiedener Parasitenkonzentrationen (5×10^6 PE/100 μl und 1×10^7 PE/100 μl) der hypoton permeabilisierten und unbehandelten, intakten Parasiten wurden anschließend zentrifugiert. 2 μl des Überstandes (entspr. 1 bzw. 2×10^5 PE) wurden in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (U-Form) pipettiert und mit PBS bzw. isotonom

Inkubationspuffer auf 50 μ l aufgefüllt. Die Parasitensedimente wurden entsprechend mit PBS bzw. isotonem Inkubationspuffer im Ausgangsvolumen resuspendiert und jeweils 2 μ l parallel zu den Überständen aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden Parallelansätze mit 1 μ l 10% Triton X-100 versetzt (Endkonzentration 0,1% Triton X-100), um die β -Galactosidase durch Zerstören der Membranstruktur vollständig freizusetzen. Zu jedem Ansatz wurden 50 μ l Chlorophenol Rot- β -D-Galactopyranosid (CPRG) zugegeben und die Platte für 25 min bei 37 °C inkubiert. Das Substrat CPRG wird hierbei durch das Enzym β -Galactosidase umgesetzt, wobei eine Farbverschiebung von Gelb nach Rot stattfindet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion mit 20 μ l Stopp-Lösung (25 mM EDTA; 500 mM Glycin pH 11,2) beendet. In Abbildung 13 A ist der Computer-Scan eines Tests dargestellt. Die Absorption wurde mit einem ELISA-Reader (Sanofi Diagnostics Pasteur, Freiburg) bei $\lambda = 570$ nm bestimmt und die Mittelwerte graphisch dargestellt (Abbildung 13 B). Bei nicht-permeabilisierten Zellen bleibt die β -Galactosidase in den Zellen und wird mit diesen sedimentiert. Nach Inkubation mit CPRG ist die β -Galactosidase-Aktivität daher im Sediment nachweisbar (Abb. 13 A, Reihen A und C). Nur ein geringer Teil der β -Galactosidase gelangt aus den bereits während der Aufarbeitung zerstörten Toxoplasmen in den Überstand. Erst nach Zugabe von Triton X-100 kann die β -Galactosidase effektiv freigesetzt werden und verbleibt nach der Zentrifugation im Überstand (Reihen B und D). Bei hypoton permeabilisierten Parasiten dagegen wird β -Galactosidase effektiv freigesetzt, gelangt nach der Zentrifugation in den Überstand und kann dort nachgewiesen werden (Reihe E). Nur ein geringer Anteil verbleibt in Parasiten, die vermutlich nicht vollständig permeabilisiert wurden.

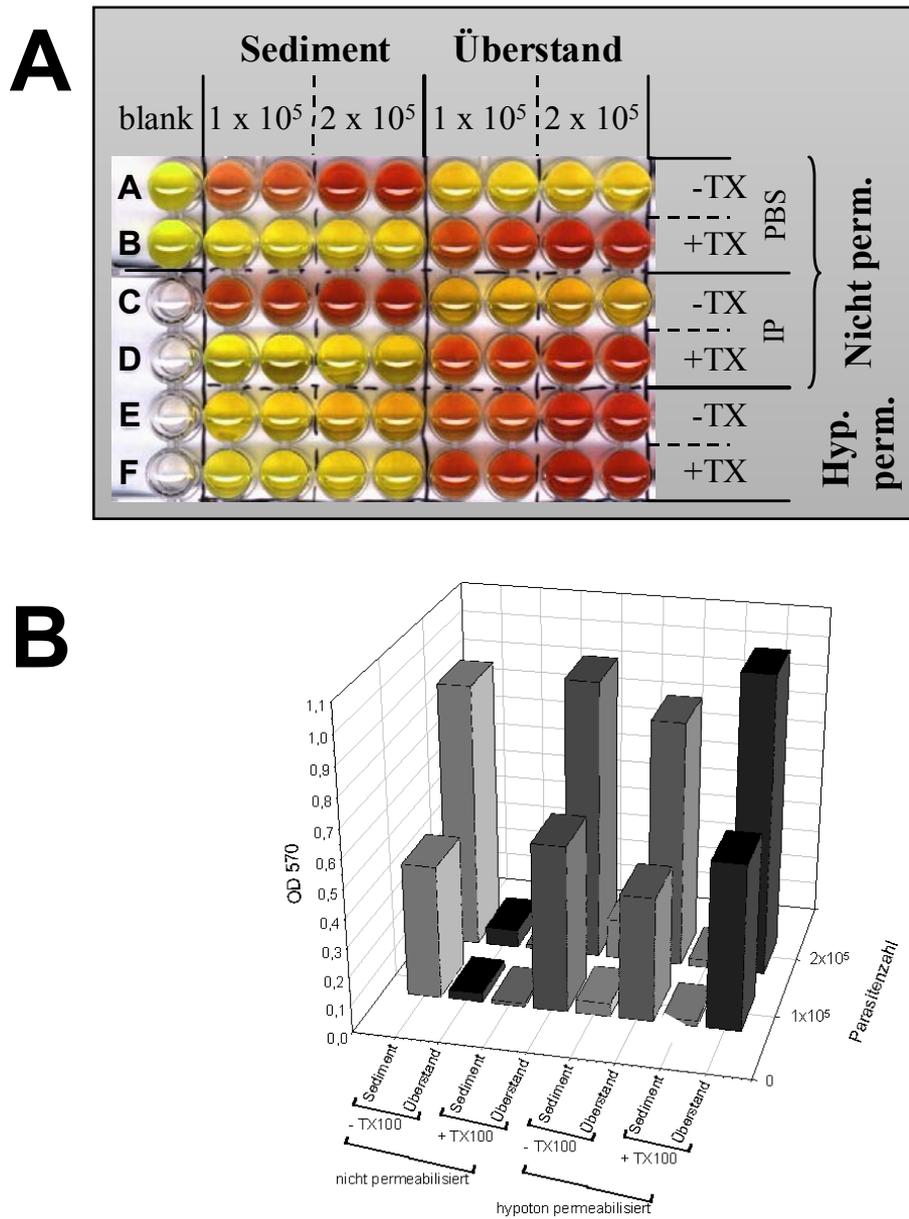


Abb. 13: β -Galaktosidase-Test zur Überprüfung der Semipermeabilisierung von *T. gondii*

Ein stabil mit dem lacZ-Gen transfizierter Stamm, der β -Galaktosidase cytoplasmatisch exprimiert wurde verwendet, um die Permeabilisierung nach der hypotonen Lyse darzustellen. Hypoton permeabilisierte, bzw. intakte RH β -1 Toxoplasmen wurden in Dublikaten und verschiedenen Zellkonzentrationen zentrifugiert, Aliquots des Überstandes ($\equiv 1$, bzw. 2×10^5 PE) wurden in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (U-Form) pipettiert und mit PBS (Reihen A + B), bzw. isotonem Inkubationspuffer (IP, Reihen C - F) auf 50 μ l aufgefüllt. Das Parasitensediment wurde im Ausgangsvolumen resuspendiert und entsprechende Mengen parallel zu den Überständen aufgetragen. Zur Positivkontrolle wurden Parallelansätze mit 0,1% Triton X-100 (+TX) versetzt. Zu jedem Ansatz wurden 50 μ l CPRG zugegeben, 25 min bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert und die Reaktion mit 20 μ l Stopp-Lösung beendet (Abb. 13 A = Scan der Mikrotiterplatte). B zeigt die graphische Darstellung der Absorption bei 570 nm der Reihen C - F. Bei nicht permeabilisierten Parasiten bleibt die β -Galaktosidase-Aktivität fast vollständig im Sediment erhalten. Erst nach hypotoner Lyse, bzw. Zugabe von Triton X-100 läßt sich die β -Galaktosidase-Aktivität im Überstand nachweisen. Blank = 50 μ l isotoner Inkubationspuffer + 50 μ l CPRG.

4.1.8 Zellkompartimente werden durch die Behandlungen nicht zerstört

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Parasitenzellen durch hypotonen Puffer effektiv permeabilisiert werden können, ist es von entscheidender Bedeutung für das gewählte System, daß das ER durch diese Behandlung nicht zerstört wird. Um dies zu zeigen, wurde ein Protease-Schutztest durchgeführt, bei dem luminale Proteine des ER vor dem Verdau geschützt bleiben sollen. Zunächst wurde die Konzentration an Proteinase K ermittelt, die nötig ist, um das zu untersuchende Protein effektiv zu verdauen. Hypoton permeabilisierte Toxoplasmen wurden für 30 min auf Eis in Anwesenheit eines Detergenz mit unterschiedlichen Konzentrationen an Proteinase K behandelt (Abb. 14 A, Spuren 2-6). Der Proteinverdau wurde durch Zugabe von PMSF gestoppt und die verbliebenen Proteine mittels Trichloressigsäure gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und auf PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurden Immunfärbungen nach dem Western-Blot-Verfahren durchgeführt. Der Nachweis eines Proteins des ER-Lumens (ER Chaperon GRP78 oder BiP) erfolgte mit einem Antikörper, der freundlicherweise von Dr. J. Bangs, Madison, USA zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Antikörper ist eigentlich gegen BiP von *T. brucei* gerichtet, es besteht jedoch eine Kreuzreaktivität mit BiP von *T. gondii*. Die Detektion erfolgte über ein Peroxidase-Konjugat (swine α -rb HRP, Dako, Dänemark) und Chemolumineszenz-Substrat (ECL-System, Amersham, Braunschweig). Bei einer Proteinase-Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ wird BiP nahezu vollständig abgebaut. Eine Erhöhung auf 750 $\mu\text{g/ml}$ brachte keine wesentliche Steigerung des Abbaues. Spur 1 zeigt nun, daß das luminale Protein BiP vor dem Verdau geschützt bleibt, erst nach Zugabe eines Detergenz kann das Protein abgebaut werden (Abb. 14 A, Spur 3 vs. 1). Das bedeutet, daß durch hypotone Permeabilisierung zwar die Zellmembran durchlässig wird, nicht aber das ER. Bei diesem Ansatz wurde durch die Detergenz-Zugabe die gesamte Population von BiP nach TCA-Fällung erfaßt.

Ergänzend dazu wurden Parasiten nach simulierter radioaktiver Markierung (Abb. 14 B, Spur 4) und anschließender PI-PLC Behandlung (Abb. 14 B, Spur 5) getestet. Es wurden hypoton permeabilisierte Toxoplasmen für 30 min auf Eis mit 500 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K behandelt, die Aufarbeitung und weitere Behandlung der Proben erfolgte wie oben beschrieben. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit Proteinase K-Puffer behandelt (Abb. 14 B, Spur 2), als Positivkontrolle wurden Parallelansätze mit Triton X-100 versetzt (Endkonzentration 0,1% Triton X-100; Abb. 14 B, Spur 1). Spur 3 zeigt die Parasiten vor einer radioaktiven Markierung (analog zu Abb. 14 A, Spur 1). Weder Bedingungen, die für die radioaktive Markierung verwendet werden (Spur 4), noch die anschließende PI-PLC Behandlung (Spur 5) zerstören die ER-Membran in permeabilisierten Zellen oder heben ihre ursprüngliche Orientierung auf.

Als zusätzliche Kontrolle wurden die Rhoptrien auf ihre Integrität überprüft. Der Nachweis der Rhoptrienproteine (ROP2, 3 und 4) erfolgte mit einem Antikörper, der

freundlicherweise von Dr. J.-F. Dubremetz, Montpellier, Frankreich, zur Verfügung gestellt wurde. Der Versuch wurde analog zu dem BiP-Nachweis durchgeführt, das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Auch die Rhoprienproteine sind vor dem Verdau mit Proteinase K geschützt, nach Detergenz-Zugabe können sie verdaut werden (Spur 1 vs. 2). Spur 3 zeigt die Negativkontrolle ohne Zugabe von Proteinase K.

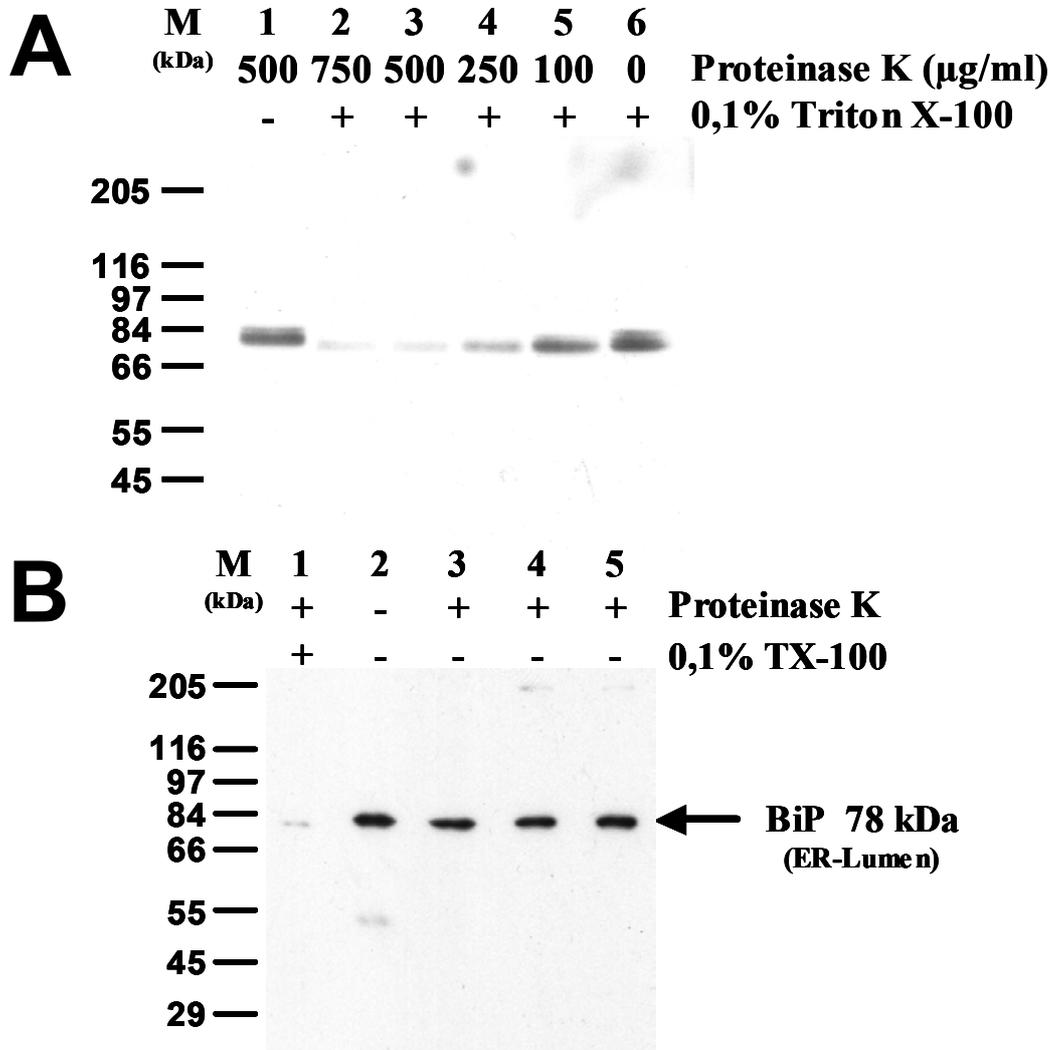


Abb. 14: Protease-Schutztest zur Überprüfung der Integrität des ER

A: Hypoton permeabilisierte Parasiten wurden zur Kontrolle der Unversehrtheit des ER mit Proteinase K behandelt (Spur 1). Einer Negativkontrolle wurde kein Enzym beigesetzt (Spur 6) und Positivkontrollen nach Zusatz von 0,1% Triton X-100 mit unterschiedlichen Mengen Proteinase K (Spuren 2-5) inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Proteine präzipitiert und mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt. Die Immunfärbung nach dem Western-Blot-Verfahren erfolgte mit einem Antikörper, der gegen ein luminales Protein des ER (BiP) gerichtet ist. BiP kann nur nach Zusatz eines Detergenz verdaut werden (Spur 1 vs. Spur 3).

B: Ergänzend wurden Parasiten nach simulierter radioaktiver Markierung (Spur 4) und anschließender PI-PLC-Behandlung (Spur 5) getestet. Weder die Bedingungen, die für die radioaktive Markierung verwendet werden (Spur 4), noch die PI-PLC-Behandlung (Spur 5) zerstören die ER-Membran in permeabilisierten Zellen. Spur 3 zeigt die Parasiten vor der radioaktiven Markierung. Einer Negativkontrolle wurde kein Enzym beigesetzt (Spur 2) und eine Positivkontrolle nach Zusatz von 0,1% Triton X-100 (TX-100, Spur 1) inkubiert.

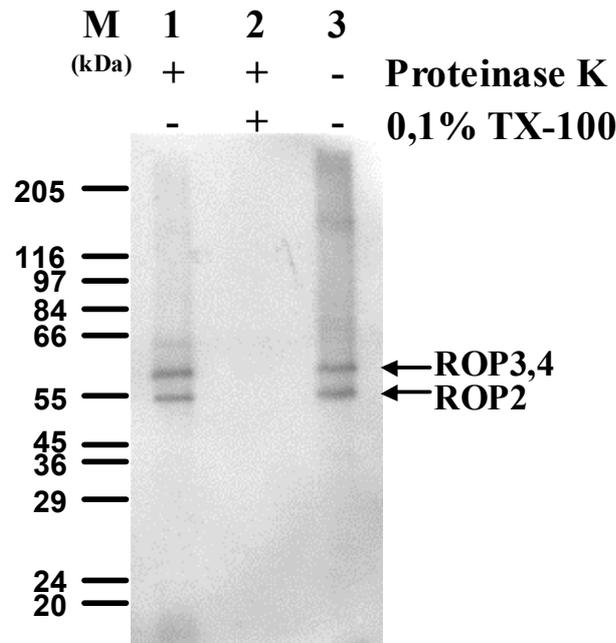


Abb. 15: Protease-Schutztest zur Überprüfung der Integrität der Rhoptrien

Hypoton permeabilisierte Parasiten wurden zur Kontrolle der Unversehrtheit der Rhoptrien mit Proteinase K behandelt (Spur 1). Einer Negativkontrolle wurde kein Enzym beigesetzt (Spur 3) und eine Positivkontrolle nach Zusatz von 0,1% Triton X-100 (TX-100, Spur 2) inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Proteine präzipitiert und mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt. Die Immunfärbung nach dem Western-Blot-Verfahren erfolgte mit einem Antikörper, der gegen die Rhoptrienproteine 2, 3 und 4 (ROP2, 3 und 4) gerichtet ist. ROP2, 3 und 4 sind vor dem Verdau geschützt und können nur nach Zusatz eines Detergenz verdaut werden (Spur 2 vs. Spur 1).

4.1.9 Ultrastrukturelle Darstellung von Toxoplasmen nach hypotoner Permeabilisierung

Neben den bereits beschriebenen Versuchen zur Untersuchung der Permeabilisierung von Toxoplasmen und der Integrität von Zellorganellen permeabilisierter Zellen wurden Parasiten auf ultrastruktureller Ebene untersucht. Dazu wurden freie Toxoplasmen jeweils unbehandelt (intakt), direkt nach hypotoner Permeabilisation, nach simulierter radioaktiver Markierung (2 h, 37 °C) und nach anschließender PI-PLC-Behandlung fixiert, dehydriert und eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem LKB Ultramikrotom (Stockholm, Schweden) angefertigt, gefärbt und mit einem Zeiss 109 Elektronenmikroskop untersucht (mit freundlicher Unterstützung von Dr. J.-F. Dubremetz). Von den verschiedenen Präparationen wurden Photos angefertigt (Abbildung 16). Abbildung 16 A zeigt eine aus den Wirtszellen freigesetzte und gereinigte, intakte *T. gondii*-Zelle. Zu erkennen ist der Apikalkomplex mit seinen Organellen Conoid (C), Rhoptrien (R) und Mikronemata (m), der Zellkern (N), das Mitochondrium (M) und der Golgi-Apparat (G). Umschlossen wird die Zelle von der mehrschichtigen Pellicula (P) und ausgefüllt ist sie mit elektronendichtem cytosolischem Material.

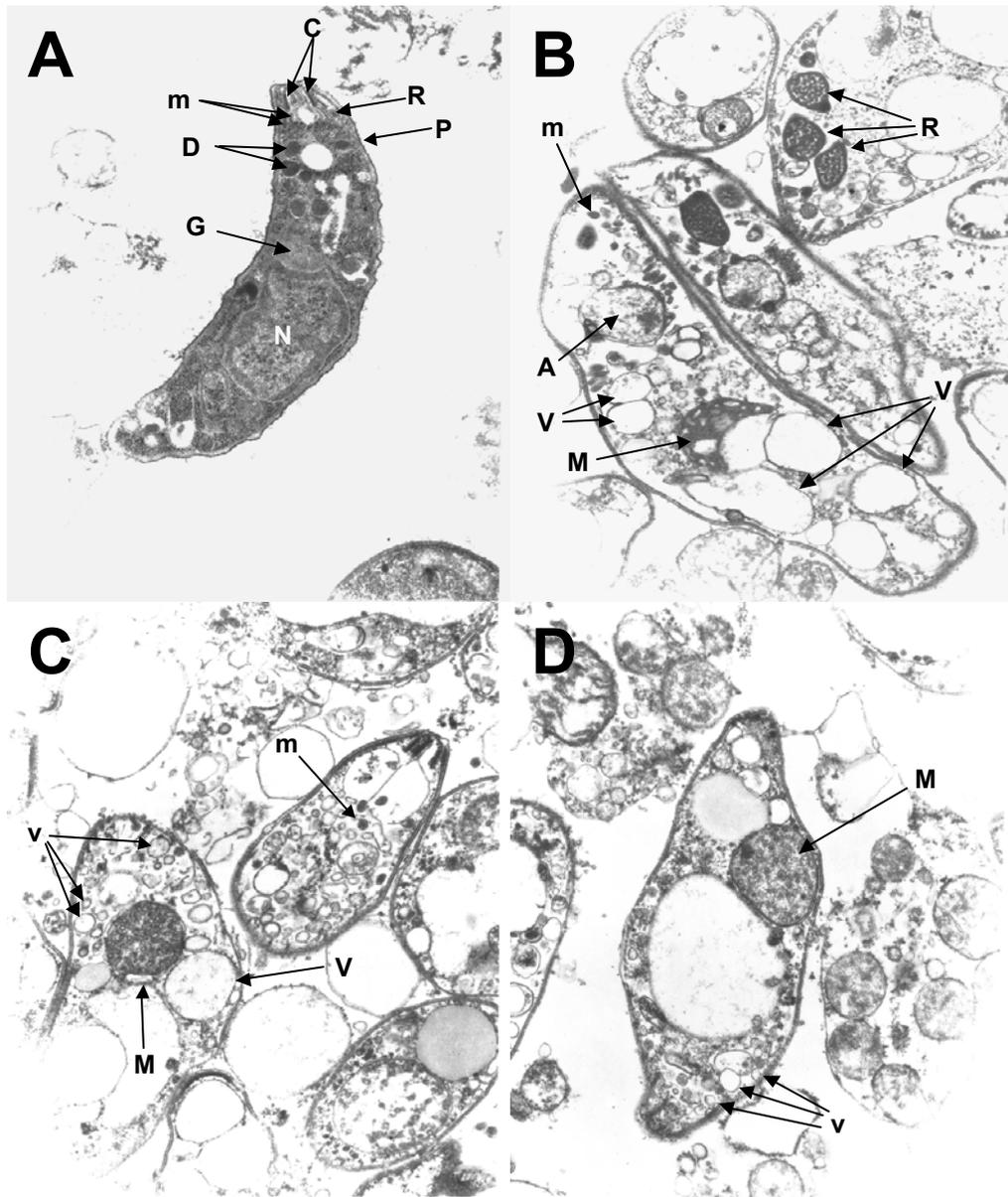


Abb. 16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *T. gondii*-Tachyzoiten nach unterschiedlichen Behandlungen

Parasiten wurden jeweils unbehandelt (A), direkt nach hypotoner Permeabilisierung (B), nach anschließender simulierter radioaktiver Markierung (C) und zusätzlicher PI-PLC-Behandlung (D) fixiert und eingebettet. Schnitte dieser Präparationen wurden anschließend im Elektronenmikroskop analysiert. Intakte Toxoplasmen zeigen die typische gebogene Form und das Zellinnere ist elektronendicht. Hypoton permeabilisierte Parasiten besitzen noch eine deutliche äußere Zellbegrenzung, haben jedoch nicht mehr ihre typische Form und weisen nur sehr wenig elektronendichten Inhalt auf. A = Apicoplast, C = Conoid, D = dichte Granula, G = Golgi-Apparat, m = Mikronemata, M = Mitochondrium, N = Zellkern, P = Pellicula, R = Rhoptries, v = kleine Vesikel, V = Vesikel.

In Abbildung 16 B sind Parasiten nach hypotoner Permeabilisierung zu sehen. Die Zellen besitzen zwar nicht mehr ihre typische gebogene Form, es ist jedoch noch eine deutliche äußere Zellbegrenzung vorhanden. Der gesamte cytoplasmatische Inhalt inklusive freier Ribosomen hingegen scheint aus den Zellen ausgetreten und ausgewaschen zu sein. Viele der Organellen, wie Rhoptrien, Mikronemata, Mitochondrium und Apicoplast, werden in den Zellen zurückgehalten und sind nach wie vor erkennbar. Auffällig sind zahlreiche große Vesikel (V) im Zellinneren, die sich durch Verschmelzen von Membranen gebildet haben. Diese Membranen könnten vom ER oder vom Golgi-Apparat stammen (pers. Mitteilung von Dr. J.-F. Dubremetz). Im weiteren Verlauf der Behandlung, also nach simulierter radioaktiver Markierung für 2 h bei 37 °C (Abb. 16 C) sowie anschließender PI-PLC-Behandlung für 30 min bei 0 °C (Abb. 16 D) sind diese als größere (V) und kleinere (v) Vesikel zu sehen.

4.1.10 Geeignete Inkubationsbedingungen für die PI-PLC-Spaltung

Das Standardprotokoll für die Spaltung von GPIs mit PI-PLC sieht einen speziellen PI-PLC-Puffer (100 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 mit 0,1% Desoxycholat) und eine Inkubation von 60–180 min bei 37 °C vor. Da diese Bedingungen für die geplanten Untersuchungen ungeeignet sind, wurden andere Puffer und Inkubationsverhältnisse getestet. Als Puffer wurden die beiden Inkubationspuffer (inklusive aller zusätzlichen Co-Faktoren wie Nukleotidzucker, ATP und CoA) getestet, die für die radioaktive Markierung früher bzw. höher glycosylierter und modifizierter GPI-Biosyntheseintermediate verwendet werden (Inkubationspuffer A und B, siehe 3.3.5). Eine Inkubationstemperatur von 37 °C kann nicht eingehalten werden, da bei dieser Temperatur die GPI-Biosynthese und damit der Einbau von Radioaktivität in GPI-Biosyntheseintermediate weiterhin erfolgen kann. Es wurde daher getestet, ob bei einer Reduktion der Inkubationstemperatur auf 0 °C noch eine effektive Spaltung von GPIs stattfinden kann. Bei dieser Temperatur sollte zum einen die GPI-Biosynthese auf ein Minimum reduziert sein, zum anderen sollte die Übertragung von Glycolipiden über die ER-Membran ("flip-flop") verhindert werden, damit die auf einer Seite der ER-Membran synthetisierten Intermediate während der PI-PLC-Behandlung nicht auf die andere Seite der Membran gelangen können.

Mit [³H]GlcN markierte Glycolipidextrakte (10.000 cpm/Ansatz) wurden getrocknet, im entsprechenden Puffer resuspendiert und mit PI-PLC (Glyco; 6 U/ml im Ansatz) versetzt. Zwei Ansätze in den Inkubationspuffern A und B wurden 30 min bei 0 °C inkubiert, zwei Parallelansätze und ein weiterer Kontrollansatz in PI-PLC-Standard-Puffer wurden 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen der Proben gestoppt und die Reaktionsprodukte durch Butanol-Wasser-Verteilung getrennt. Die Radioaktivitätsverteilung der einzelnen Ansätze wurde bestimmt, indem

Aliquots beider Phasen im Szintillationszähler gemessen wurden. Die prozentuale Verteilung zwischen Wasser- (gespaltenes Material) und Butanol-Phase (ungespalten) wurde graphisch dargestellt (s. Abb. 17). Die Kontrollspaltung im Standard-Puffer (90 min, 37 °C) erbrachte eine Spaltungseffizienz von knapp 90%. Die beiden Ansätze in den Inkubationspuffern zeigten bei gleichen Inkubationsbedingungen einen Anteil gespaltenener Phospholipide von 94% (IP A) und 81% (IP B). Die Umstellung auf einen anderen Puffer hat keinen großen Einfluß auf die Spaltungseffizienz. Die Anwesenheit von EDTA (IP A) scheint die Reaktion zu begünstigen (Smith *et al.*, 2001). Werden die Reaktionszeit auf 30 min und die Temperatur auf 0 °C herabgesetzt, werden die Phospholipide trotzdem mit sehr hoher Effizienz gespalten. So wird in Inkubationspuffer A eine Spaltungseffizienz von 98% und in Inkubationspuffer B von 94% erreicht. Auch hier wird bei Anwesenheit von EDTA eine bessere Spaltung erzielt. Die gewünschten Versuchsbedingungen sind daher sehr gut geeignet, eine effektive Spaltung von Phosphatidylinositolen mit PI-PLC zu erreichen.

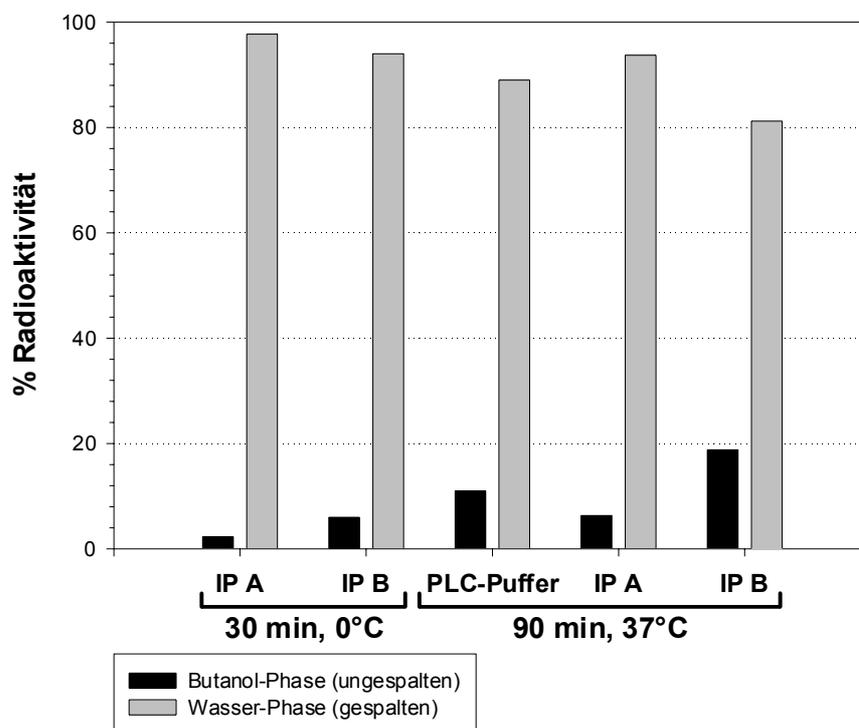


Abb. 17: Test verschiedener Inkubationsbedingungen für die PI-PLC Spaltung

Mit [³H]GlcN markierte Glycolipide von *T. gondii* wurden unter verschiedenen Inkubationsbedingungen mit PI-PLC behandelt. Ein Kontrollansatz wurde im Standard-Puffer 90 min bei 37 °C inkubiert. Zwei weitere Ansätze wurden parallel in Inkubationspuffern A (IP A) und B (IP B) behandelt, die für radioaktive Markierungen früher bzw. höher glycosylierter und modifizierter GPI-Biosyntheseintermediate verwendet werden. Im Kontrollansatz wurden knapp 90% der Glycolipide gespalten, in den Parallelansätzen jeweils 94% bzw. 89%. Werden die Inkubationszeit auf 30 min und die Temperatur auf 0 °C gesenkt, so werden 98% (IP A) bzw. 94% (IP B) des Materials gespalten.

4.1.11 PI-PLC-Spaltung in Abhängigkeit von der Zeit

Um eine möglichst optimale Zeitspanne für die Spaltung radioaktiv markierter Glycolipide in permeabilisierten Zellen zu ermitteln, wurde die Spaltungseffizienz in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Dabei sollte eine Reaktionszeit ermittelt werden, die möglichst kurz ist, aber eine effektive Spaltung von Glycolipiden gewährleistet.

Aus den Wirtszellen befreite und gewaschene Parasiten wurden hypoton permeabilisiert, erneut gewaschen und in Inkubationspuffer A zu 5×10^8 PE/ml resuspendiert. Pro Ansatz wurden 5×10^7 PE mit 3 μCi UDP- ^3H GlcNAc, ATP und CoA komplementiert und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die radioaktive Markierung wurde durch Platzieren der Proben auf Eis gestoppt. Anschließend wurden pro Ansatz 0,6 U PI-PLC (*B. thuringiensis*, 6 U/ml Endkonzentration) zugegeben und die Proben auf Eis inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Spaltungen durch Zugabe von 700 μl C/M 1:1 (v/v) gestoppt. Zusammen mit dem Reaktionsgemisch ergibt sich daraus ein Verhältnis C/M/W von 10:10:3 (v/v/v). Dies ist gleichzeitig der erste Schritt der Glycolipidextraktion. Nach sequentieller Extraktion und anschließender Phasenverteilung zwischen wassergesättigtem Butanol und Wasser wurde die Radioaktivität in den jeweiligen Phasen im Szintillationszähler ermittelt. Zum Zeitpunkt 0 min sind 0% des Materials gespalten, das heißt 100% des Materials sind theoretisch noch spaltbar. Die Spaltungseffizienz zu den einzelnen Zeitpunkten wurde graphisch dargestellt (Abb. 18) und mit Hilfe des Programmes SigmaPlot 4.0 eine Regressionskurve erstellt. Anhand der Regressionskurve ergibt sich bereits nach ca. 5 min eine Spaltung von 50% des vorhandenen Materials. Etwa ab diesem Zeitpunkt beginnt die Kurve sich deutlich abzuflachen und es wird eine Sättigung bei etwas über 73% Spaltung erreicht. Diese Sättigung bei weniger als 100% ergibt sich durch einen Anteil PI-PLC-insensitiven Materials, der aufgrund einer Acylierung am Inositol nicht spaltbar ist (vgl. 4.2.2; Abb. 21). Der Anteil nicht spaltbaren Materials vom Gesamtmaterial hängt vom jeweiligen Markierungsexperiment ab und schwankt bei verschiedenen Markierungen mit UDP- ^3H GlcNAc zwischen 10% und 50%. Dieser Anteil kann nach Analyse der DC mit dem Berthold Analyser und Auswertung mit dem dazugehörigen Programm (Chroma, Berthold) durch Integration bestimmt werden und als interner Standard zur Normalisierung genutzt werden. Der Anteil nicht spaltbaren Materials betrug bei dem beschriebenen Versuch ca. 25% (in Abb. 18 angezeigt durch eine gepunktete Linie). Für die zukünftigen Versuche wurde eine Inkubationszeit von 30 min ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt eine fast komplette Spaltung (97%) allen spaltbaren Materials erreicht wird.

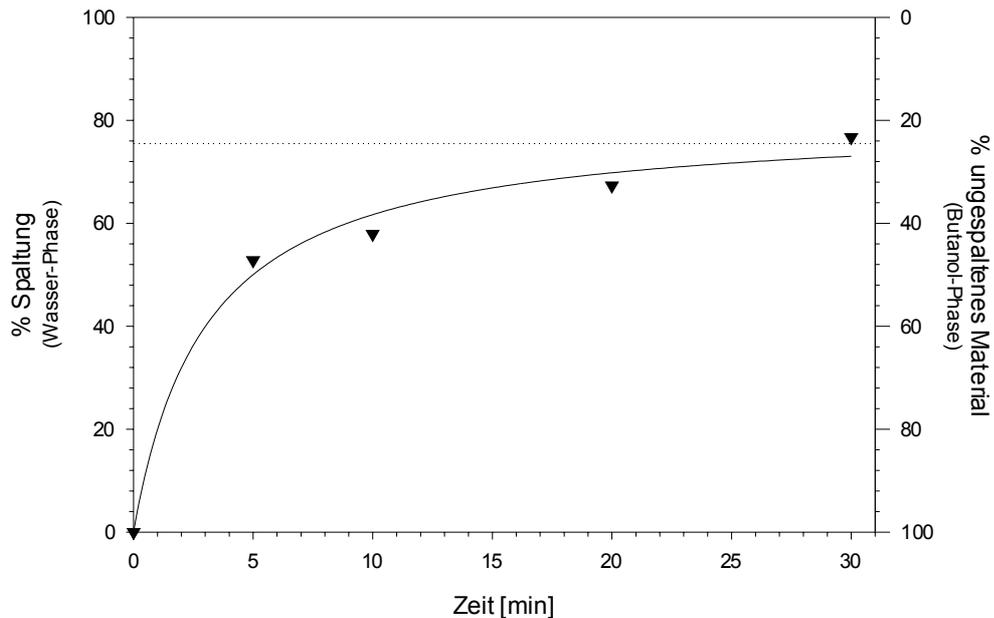


Abb. 18: Abhängigkeit der Spaltungseffizienz von der Inkubationszeit

Freie Toxoplasmen wurden hypoton permeabilisiert und mit UDP- $^{[3]H}$ GlcNAc radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis mit PI-PLC behandelt und die Inkubation nach unterschiedlichen Zeiten ($t = 0, 5, 10, 20$ und 30 min) gestoppt. Die Glycolipide wurden extrahiert und die Menge der eingebauten Radioaktivität bestimmt. Die Spaltungseffizienz wurde graphisch dargestellt ($t_0 = 0\%$) und mit Hilfe eines Computerprogramms (SigmaPlot) eine Regressionskurve berechnet. Bereits nach 5 min wurden 50% des gesamten Materials gespalten, nach 30 min waren es ca. 73% . Der aufgrund einer zusätzlichen Acylgruppe am Inositol nicht spaltbare Anteil wurde auf $24,5\%$ bestimmt (gepunktete Linie).

4.1.12 PI-PLC Spaltung in Abhängigkeit von der Konzentration

In einem ähnlichen Versuch wurde die Abhängigkeit der Spaltungseffizienz von der eingesetzten Enzymkonzentration untersucht, um eine optimale Enzymmenge für die geplanten Spaltungsversuche zu ermitteln.

Wie unter 4.3.5 beschrieben wurden freie Toxoplasmen hypoton permeabilisiert und radioaktiv mit UDP- $^{[3]H}$ GlcNAc markiert. Die Reaktion wurde durch Platzieren der Ansätze auf Eis gestoppt. Anschließend wurden zu verschiedenen Ansätzen unterschiedliche Mengen PI-PLC gegeben (*B. thuringiensis*, Endkonzentrationen: $0; 0,12; 0,6; 1,2$ und 6 U/ml) und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von $700 \mu\text{l}$ C/M $1:1$ (v/v) gestoppt, die Glycolipide extrahiert und mittels Butanol-Wasser-Verteilung gereinigt. Die Radioaktivität in den jeweiligen Phasen wurde im Szintillationszähler ermittelt. Die Spaltungseffizienz bei den unterschiedlichen PI-PLC-Konzentrationen wurde graphisch dargestellt (Abb. 19), wobei die Negativkontrolle ohne Enzym 0% Spaltung bzw. 100% theoretisch spaltbares Material bedeuten. Anschließend wurde mit dem Computerprogramm SigmaPlot eine Regressionskurve berechnet. Anhand dieser Regressionskurve läßt sich ermitteln, daß 50% des gesamten Materials bereits bei einer Konzentration von $0,76$ U/ml PI-PLC gespalten werden. Ab diesem Punkt nimmt die Steigung der Kurve stark ab und bildet

ein Plateau bei ca. 65% Spaltung. Der Anteil nicht spaltbaren Materials wurde bei diesem Versuch mit 28,1% ermittelt (in Abb. 19 durch eine gepunktete Linie dargestellt). Für die geplanten Versuche wurde eine PI-PLC Konzentration von 3 U/ml festgelegt. Bei dieser Konzentration kann bereits ein Anteil von 86% des spaltbaren Materials umgesetzt werden. Eine Verdoppelung der Enzymkonzentration bewirkt eine Erhöhung der Spaltungseffizienz um lediglich vier Prozentpunkte.

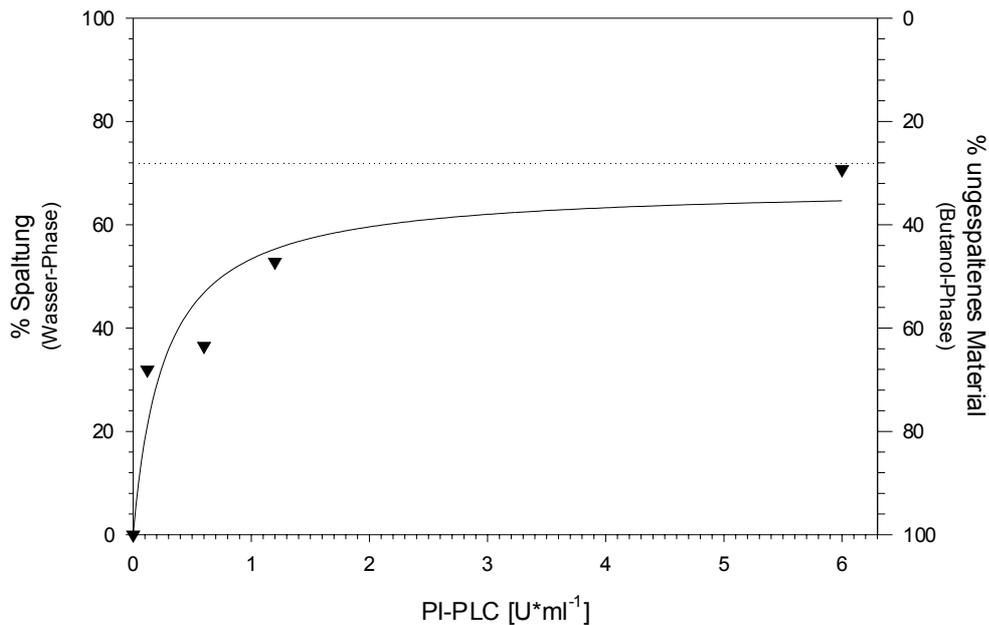


Abb. 19: Abhängigkeit der Spaltungseffizienz von der Enzymkonzentration

Freie Toxoplasmen wurden hypoton permeabilisiert und mit UDP-[³H]GlcNAc radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Proben mit unterschiedlichen Mengen PI-PLC (Endkonzentrationen: 0; 0,12; 0,6; 1,2 und 6 U/ml) für 30 min auf Eis behandelt. Die Glycolipide wurden extrahiert und die Menge der eingebauten Radioaktivität bestimmt. Die Spaltungseffizienz wurde graphisch dargestellt ($c_0 = 0\%$) und mit Hilfe eines Computerprogramms (SigmaPlot) eine Regressionskurve berechnet. Bereits mit $0,76 \text{ U*ml}^{-1}$ wurden 50% des gesamten Materials gespalten, mit 6 U/ml waren es ca. 65%. Der aufgrund einer zusätzlichen Acylgruppe am Inositol nicht spaltbare Anteil wurde auf 28,1% bestimmt (gepunktete Linie).

4.2 Charakterisierung von *T. gondii*-Glycolipiden

Die am effektivsten markierten Glycolipide aus *in vivo*- und *in vitro*-Markierungen zeigen in der DC deutliche Laufunterschiede (Abb. 20). Außerdem sind die Bandenmuster der unterschiedlichen Glycolipide aus der *in vitro*-Inkubation wegen auftretender *lyso*-Formen (Tomavo *et al.*, 1992b) schwer zu interpretieren. Daher wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um einzelne Glycolipide sicher ansprechen zu können.

4.2.1 *in vivo*- und *in vitro*-markierte Glycolipiden von *T. gondii* haben auf der DC unterschiedliche Laufeigenschaften

Besonders deutlich wurden die Laufunterschiede zwischen *in vivo* mit [³H]GlcN und *in vitro* mit GDP-[³H]Man markierten Glycolipiden (Abb. 20). Zum einen wurden *Toxoplasma*-Tachyzoiten 48-72 Stunden nach Infektion in Kultur für 9 Stunden bei 37 °C mit [³H]GlcN radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Parasiten aus ihren Wirtszellen freigesetzt und gereinigt und die Glycolipide mittels Zwei-Schritt-Extraktion gewonnen. Dieses Material sollte als Standard dienen. Zum anderen wurden freigesetzte und gewaschene Toxoplasmen hypoton permeabilisiert und für 2 h mit GDP-[³H]Man radioaktiv markiert. Diese Glycolipide wurden mittels Ein-Schritt-Extraktion gewonnen. Die Glycolipide wurden auf eine Silika 60 DC-Platte aufgetragen und in Laufmittelsystem B entwickelt. Abbildung 20 A zeigt einen Ausschnitt von der Dünnschichtplatte nach Darstellung der zweidimensionalen Radioaktivitätsverteilung mit dem Bio-Imager (RayTest). Spur 1 zeigt das Standard-Material nach *in vivo*-Markierung mit den Glycolipiden I-VI (Striepen *et al.*, 1997). Deutlich erkennbar sind die zwei Dreiergruppen mit den Glycolipiden I-III (mit endständigem Ethanolaminphosphat) und IV-VI (ohne Ethanolaminphosphat). Da es sich in dieser Spur um den C/M/W-Extrakt der [³H]GlcN-Markierung handelt, sind keine früheren Intermediate der GPI-Biosynthese vorhanden. Bei der Markierung mit GDP-[³H]Man (Spur 2) ist das gesamte Glycolipid-Spektrum in den hydrophoben Bereich verschoben. Die Gruppe der Glycolipide I-III ist um jeweils ca. 1,2 cm verschoben, die Glycolipide IV-VI sogar um jeweils ca. 1,6 cm. Unter der Annahme, daß der hydrophile Zuckeranteil in beiden Präparationen identisch strukturiert ist, sind diese Verschiebungen auf Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung zurückzuführen. Außerdem sind aufgrund der Ein-Schritt-Extraktion und der *in vitro*-Markierung weitere Glycolipide vorhanden: Zum einen sind hier nicht modifizierte, frühere Biosynthese-Intermediate vorhanden (Man₁, Man₂, Man₃), zum anderen sind *lyso*-Formen verschiedener Glycolipide zu erwarten (z. B. EtN-P- Man₃GalNAc-*lyso*-PI; Tomavo *et al.*, 1992b, Striepen, 1995). Die Abbildungen 20 B und C zeigen zusätzlich die eindimensionalen Radioaktivitätsprofile der Spuren 1 (20 B) und 2 (20 C).

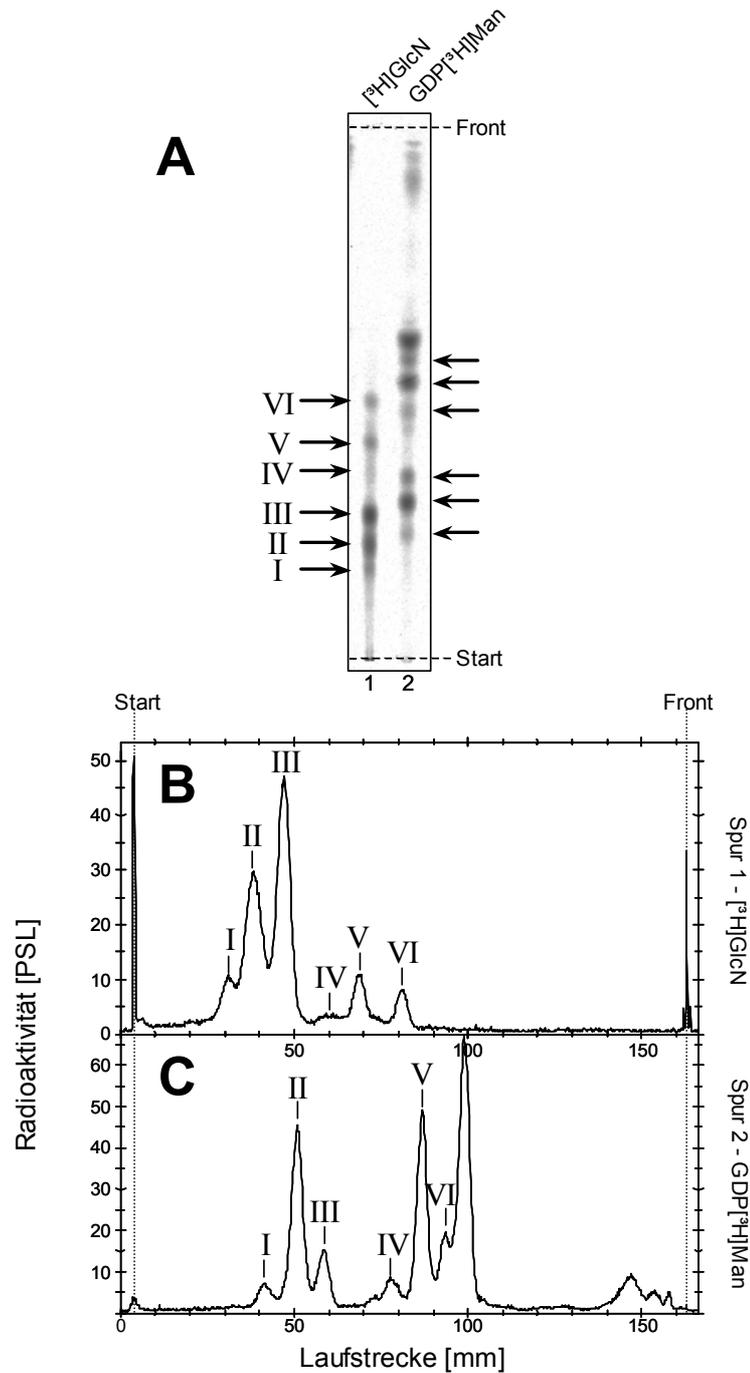


Abb. 20: Vergleich von *in vivo*- und *in vitro*-markierten Glycolipiden von *T. gondii*

Tachyzoiten von *T. gondii* wurden zum einen *in vivo* mit [³H]GlcN (A: Spur 1 und B) und zum anderen *in vitro* mit GDP-[³H]Man (A: Spur 2 und C) markiert. Die Glycolipide wurden extrahiert und dünnschichtchromatographisch analysiert. In Spur 1 ist das Standard-Material mit den Glycolipiden I-IV dargestellt (Striepen *et al.*, 1997). In Spur 2 zeigt sich eine deutliche Verschiebung dieses Glycolipid-Spektrums in den hydrophoben Bereich. Außerdem sind aufgrund des unterschiedlichen Markierungs- und Extraktionsverfahren weitere Glycolipide präsent. PSL = photostimulated luminiscence.

4.2.2 Identifizierung von *T. gondii*-Glycolipiden

Um zu zeigen, daß die veränderten Laufeigenschaften der *in vivo*- und *in vitro*-markierten Glycolipide auf Unterschiede im hydrophoben Anteil der Glycolipide (v. a. Fettsäurezusammensetzung) zurückzuführen sind, die entscheidenden hydrophilen Anteile jedoch unverändert bleiben, wurden die hydrophilen Anteile näher untersucht. Glycolipide wurden mit verschiedenen radioaktiven Komponenten (UDP-[³H]GlcNAc, GDP-[³H]Man, UDP-[³H]GalNAc und UDP-[³H]Glc) im zellfreien System markiert und mittels Ein-Schritt-Extraktion gewonnen. An den Gesamtextrakten wurden verschiedene chemische und enzymatische Spaltungen durchgeführt.

4.2.2.1 Charakterisierung nach UDP-[³H]GlcNAc-Markierung

Toxoplasmen wurden aus ihren Wirtszellen freigesetzt, gewaschen und hypoton lysiert. Anschließend wurden die Parasiten mit UDP-[³H]GlcNAc für 2 h bei 37 °C inkubiert. Um nur frühe, nicht modifizierte oder mannosylierte Intermediate zu erhalten, wurde die Markierung in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen (v. a. Mn²⁺ und Mg²⁺, durch Zugabe von EDTA) durchgeführt. Die Glycolipide wurden mittels Ein-Schritt-Extraktion gewonnen, gewaschen und Aliquots für die verschiedenen Spaltungen eingesetzt. Um die markierten Glycolipide zunächst als GPIs zu identifizieren, wurden Spaltungen mit PI-PLC, GPI-PLD und HNO₂ durchgeführt (Abb. 21 B-D). Die dazugehörige ungespaltene Negativkontrolle zeigt mehr als die erwarteten zwei Glycolipide GlcNAc-PI und GlcN-PI (Abb. 21 A). Eine der beiden Hauptkomponenten war gegenüber der Behandlung mit PI-PLC insensitiv (Abb. 21 B), was darauf schließen läßt, daß dieses Glycolipid entweder durch eine Acylierung am Inositol vor dem Verdau geschützt ist oder es sich nicht um ein GPI handelt. Die Empfindlichkeit gegenüber GPI-PLD (Abb. 21 C) und HNO₂ (Abb. 21 D) beweist dagegen, daß es sich ebenfalls um ein GPI handelt. GlcNAc-PI kann aufgrund der acylierten Aminogruppe nicht durch HNO₂ gespalten werden (Abb. 21 D). Eine milde alkalische Hydrolyse (16% NH₄⁺, 30 min, Raumtemperatur) wurde durchgeführt, um eine Acylierung des Inositols nachzuweisen. Durch diese milden Bedingungen wird vorzugsweise die Fettsäure am Inositol gespalten, wogegen die Fettsäuren des Glycerols beständiger gegenüber dieser Behandlung sind (Menon *et al.*, 1990b). Abbildung 21 E zeigt, daß das PI-PLC-insensitive Material empfindlich gegenüber Ammoniak-Behandlung ist. Sein hydrophobes Spaltprodukt migriert auf der Dünnschichtplatte nun wie das zuvor hydrophilste Intermediat GlcN-PI. Zusätzlich erscheint ein Produkt mit hydrophileren Eigenschaften bei ca. 10,5 cm. Dieses Spaltprodukt enthält vermutlich nur noch eine Fettsäure.

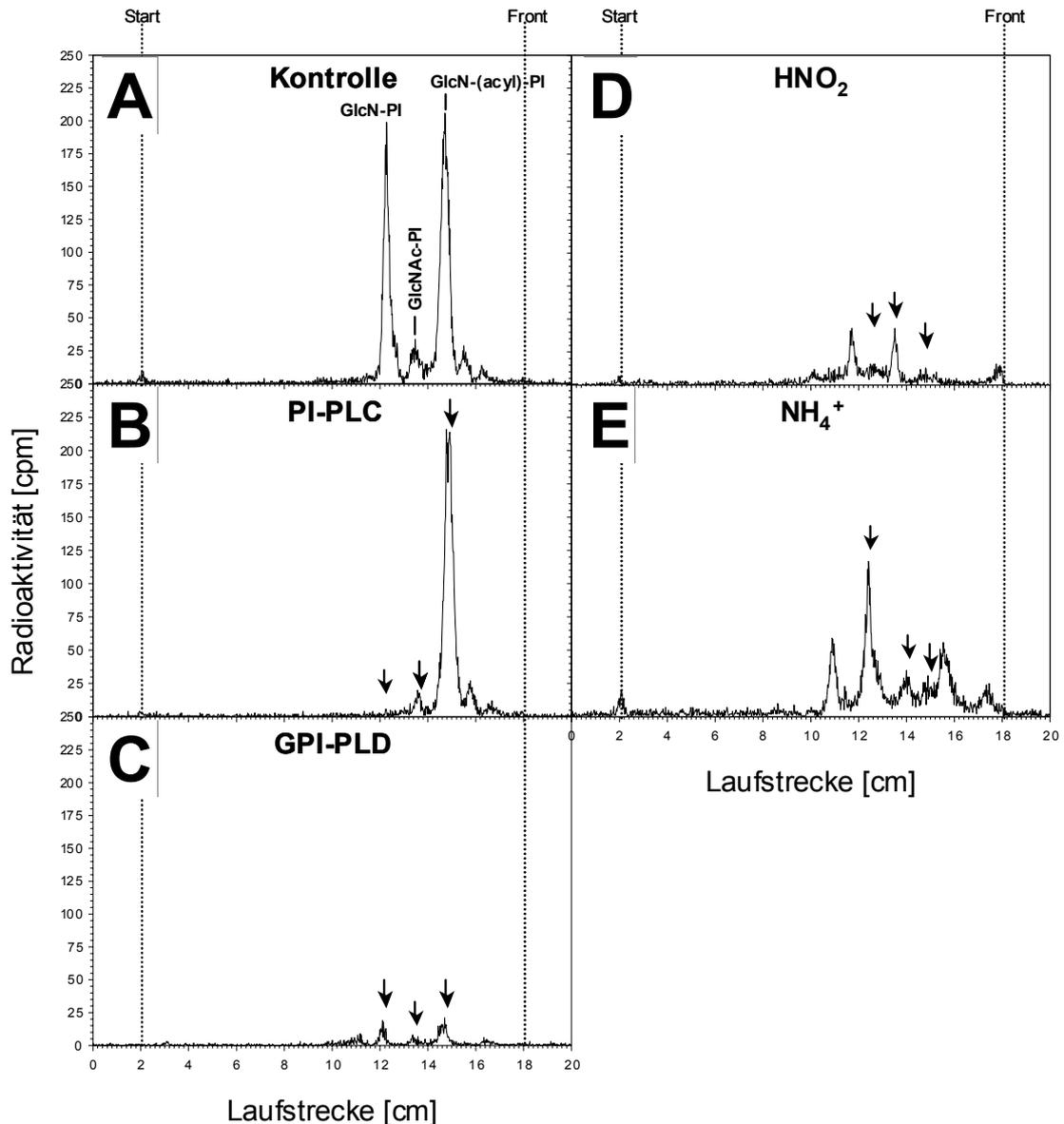


Abb. 21: Charakterisierung der mit UDP- ^3H]GlcNAc markierten Glycolipide von *T. gondii*

Mit UDP- ^3H]GlcNAc markierte Glycolipidextrakte wurden mit PI-PLC (B), GPI-PLD (C), HNO_2 (D) und NH_4^+ (E) behandelt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zwischen wassergesättigtem 1-Butanol und Wasser verteilt. Die organischen Phasen wurden auf DC-Platten im Laufmittelsystem A analysiert. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem Berthold DC-Scanner detektiert. Bild A zeigt den unbehandelten Glycolipidextrakt als Negativkontrolle. Aufgrund ihrer Spaltungseigenschaften konnten die Glycolipide GlcN-PI, GlcNAc-PI und GlcN-(acyl)PI identifiziert werden.

Es konnten nach Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc drei Intermediate identifiziert werden: GlcNAc-PI, GlcN-PI und GlcN-(acyl)PI. Diese Glycolipide komigrieren auch mit den entsprechenden Glycolipiden aus *P. falciparum* (Gerold *et al.*, 1994). Das Vorhandensein von am Inositol acylierten Intermediaten wurde schon früher beschrieben (Tomavo *et al.*, 1992b). Sichtbar werden diese Produkte jedoch nur bei *in vitro*-Markierungen, bei *in vivo*-Markierungen mit [³H]GlcN sind sie nicht darstellbar.

4.2.2.2 Charakterisierung nach GDP-[³H]Man Markierung

Nach Markierung mit GDP-[³H]Man im zellfreien System erhält man ein wesentlich komplexeres Glycolipidprofil (Abb. 22 A). Dies ist vor allem durch die Einzschritt-Extraktion bedingt, bei der in einem Schritt alle radioaktiv markierten Glycolipide gleichzeitig extrahiert werden. Deutlich erkennbar sind zwei Dreiergruppen von Glycolipiden mit relativ hydrophilen Eigenschaften. Es handelt sich um die von Boris Striepen beschriebenen Glycolipide I-VI mit den Modifikationen GalNAc +/- Glc an der innersten Mannose und +/- Ethanolaminphosphat (Striepen *et al.*, 1997). Bei den hydrophoberen, nur mit geringer Effektivität markierten Glycolipiden handelt es sich voraussichtlich um die nichtmodifizierten, mannosylierten Biosyntheseintermediate Man₁, Man₂ und Man₃. Das hydrophobste dargestellte Glycolipid nahe der Front komigriert mit einem Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man)-Standard. Dol-P-Man liefert die Mannosen für die GPI-Grundstruktur. Die Sensitivität aller Glycolipide (außer Dol-P-Man) gegenüber PI-PLC, GPI-PLD und HNO₂ zeigt, daß es sich um GPIs handelt. Speziell die Sensitivität gegenüber PI-PLC zeigt, daß in diesem Extrakt keine am Inositol acylierten Intermediate nachgewiesen werden konnten.

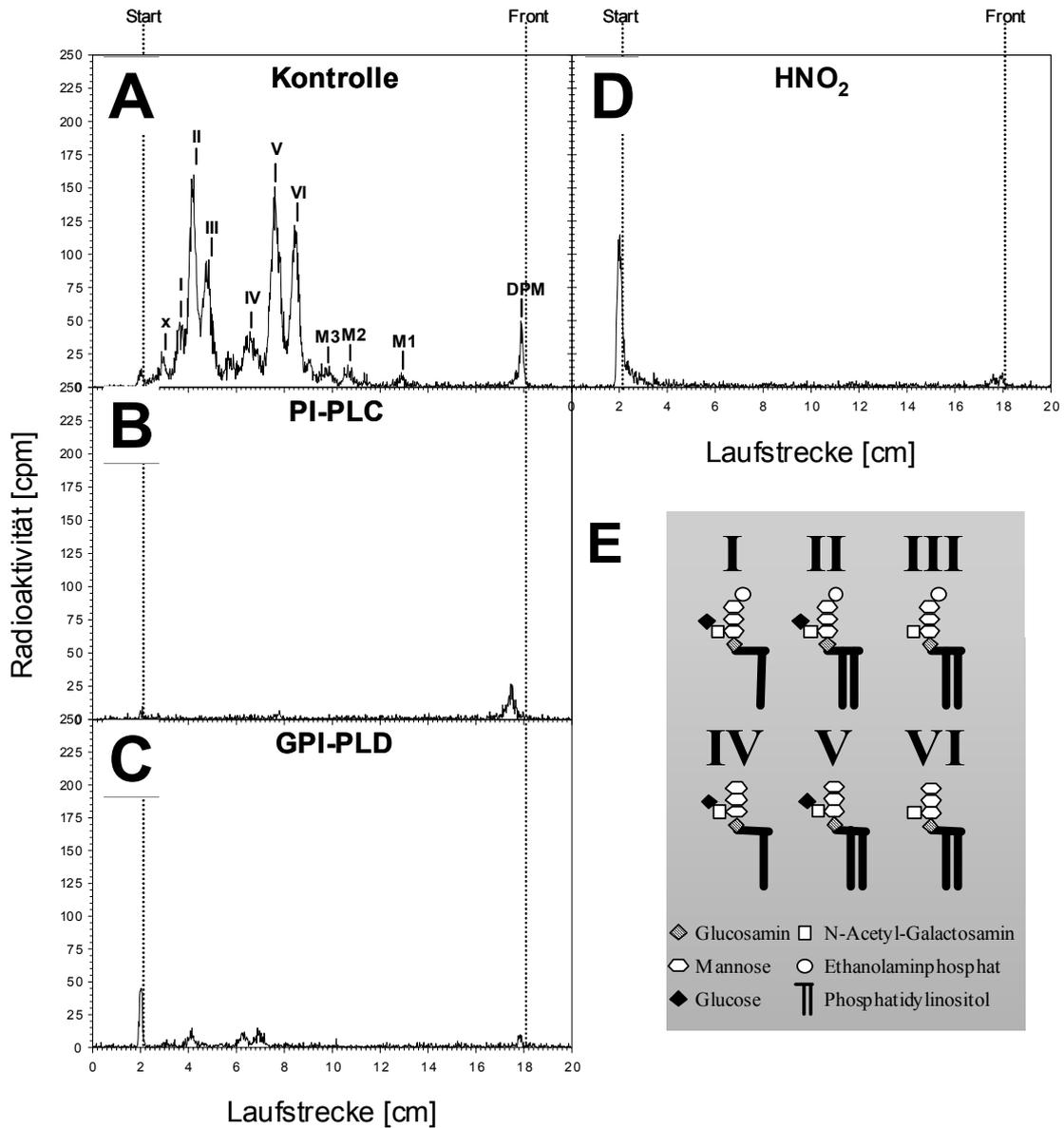


Abb. 22: Charakterisierung der mit GDP-³H]Man markierten Glycolipide von *T. gondii*
 Mit GDP-³H]Man markierte Glycolipidextrakte wurden mit PI-PLC (B), GPI-PLD (C) und HNO₂ (D) behandelt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zwischen wassergesättigtem 1-Butanol und Wasser verteilt. Die organischen Phasen wurden auf DC-Platten im Laufmittelsystem B analysiert. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem Berthold DC-Scanner detektiert. Bild A zeigt den unbehandelten Glycolipidextrakt als Negativkontrolle. Am effektivsten markiert sind die durch GalNAc +/- Glc modifizierte Glycolipide I-III (mit Ethanolaminphosphat) und IV-VI (ohne Ethanolaminphosphat). Nur schwach markiert sind die mannosylierten, nicht modifizierte Intermediate Man₁-GlcN-PI (M1) bis Man₃-GlcN-PI (M3). Bild E zeigt die schematische Darstellung der Glycolipide. DPM = Dolichol-Phosphat-Mannose.

4.2.2.3 Charakterisierung nach UDP-[³H]GalNAc- und UDP-[³H]Glc-Markierung

Um nun zu zeigen, daß es sich bei den am effektivsten markierten Glycolipiden tatsächlich um die Glycolipide I-VI handelt, wurde durch Markierungen mit UDP-[³H]GalNAc und UDP-[³H]Glc ein fokussierter Blick auf diese Intermediate geworfen. Durch die Wahl dieser radioaktiven Nukleotidzucker lassen sich gezielt die sechs GalNAc-haltigen bzw. vier Glc-haltigen Biosyntheseintermediate markieren. In Abbildung 23 A (unbehandelte Kontrolle) ist die Markierung mit UDP-[³H]GalNAc dargestellt. Deutlich erkennbar sind die zwei Dreiergruppen mit den Glycolipiden I-III bzw. IV-VI. Diese komigrieren mit den Hauptglycolipiden der GDP-[³H]Man-Markierung (Abb. 22 A). Diese Glycolipide sind ebenfalls vollständig durch PI-PLC, GPI-PLD und HNO₂ spaltbar (Abb. 23 B-D). Entsprechend dazu zeigt die Markierung mit UDP-[³H]Glc die vier glucose-haltigen Glycolipide I und II bzw. IV und V (Abb. 24 A, Negativkontrolle). Auch diese waren sensitiv gegenüber der Behandlung mit PI-PLC, GPI-PLD und HNO₂ (Abb. 24 B-D). Deutlich markiert war hier auch ein Lipid mit sehr hydrophoben Eigenschaften nahe der Lauffront. Aufgrund der Laufeigenschaften in der DC wurde es als Dolichol-Phosphat-Glucose analysiert, das jedoch *nicht* den Donor für die Glucose-Modifikation darstellt (Striepen *et al.*, 1999).

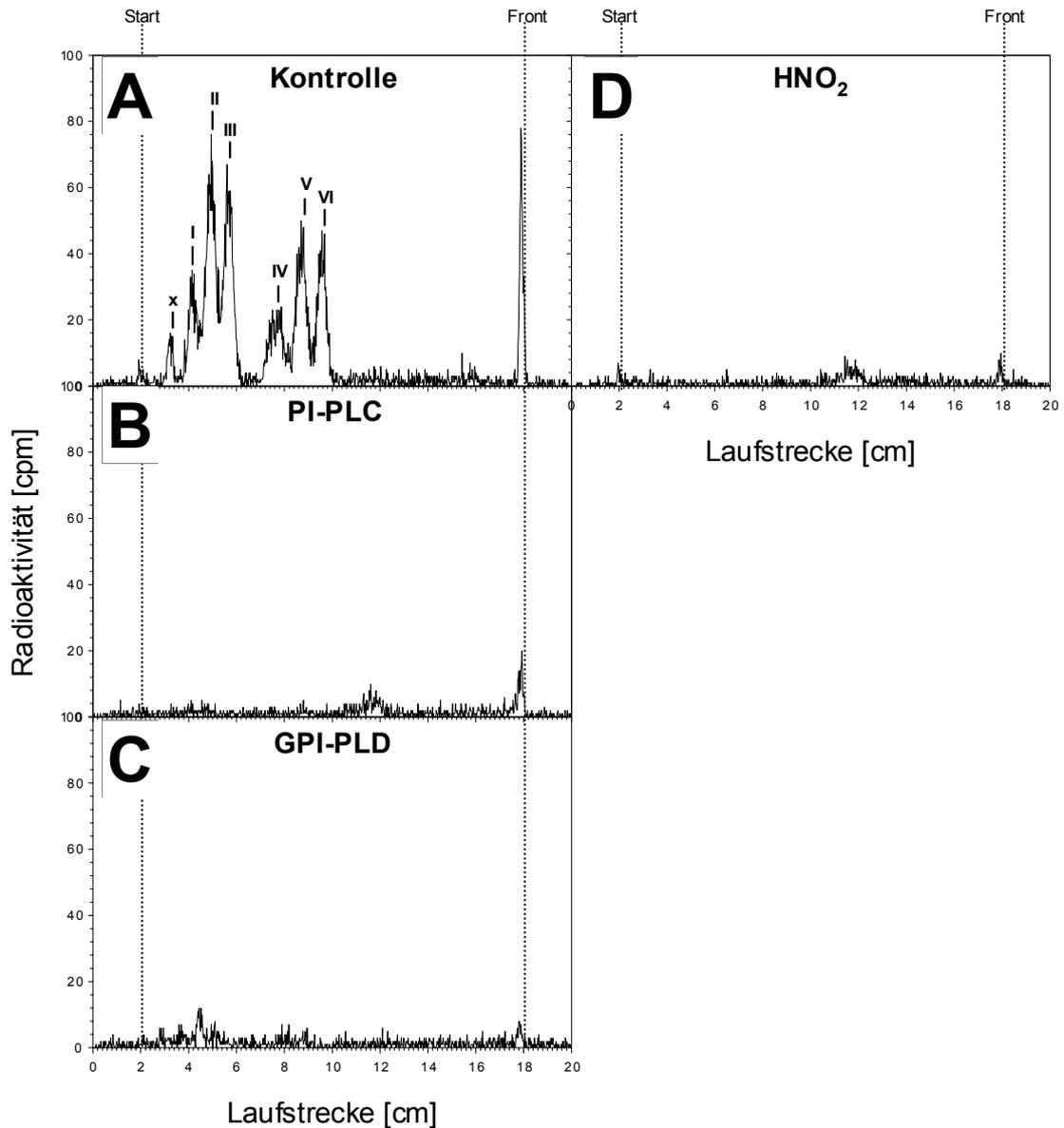


Abb. 23: Charakterisierung der UDP-[³H]GalNac-markierten Glycolipide von *T. gondii*

Mit UDP-[³H]GalNac markierte Glycolipidextrakte wurden mit PI-PLC (B), GPI-PLD (C) und HNO₂ (D) behandelt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zwischen wassergesättigtem 1-Butanol und Wasser verteilt. Die organischen Phasen wurden auf DC-Platten im Laufmittelsystem B analysiert. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem Berthold DC-Scanner detektiert. Bild A zeigt den unbehandelten Glycolipidextrakt als Negativkontrolle. Dargestellt sind alle GalNac-haltigen Glycolipide (I-VI). Ein bisher nicht charakterisiertes Glycolipid (x) wurde aufgrund seiner Sensitivität gegenüber PI-PLC, GPI-PLD und HNO₂ als GPI identifiziert.

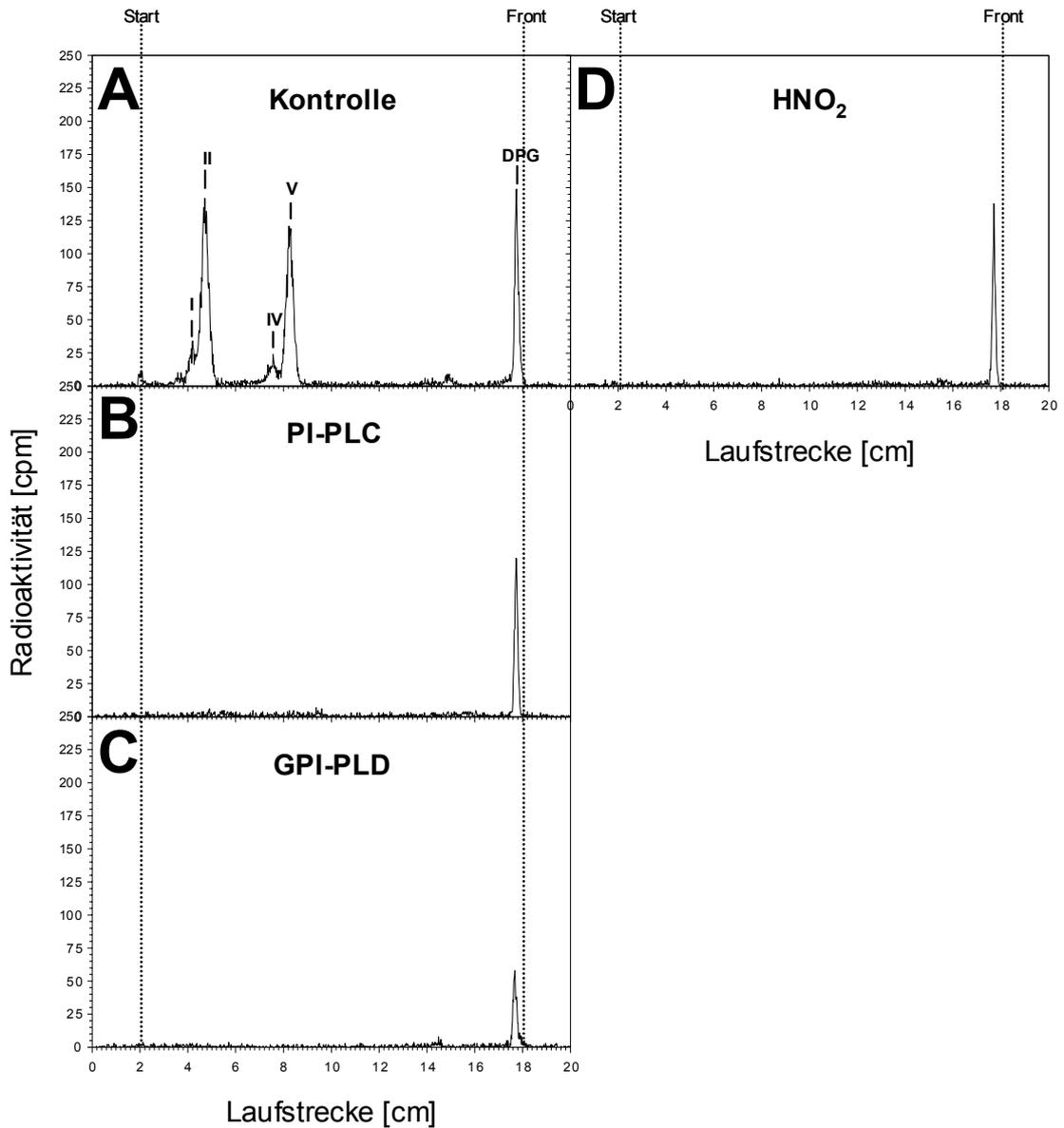


Abb. 24: Charakterisierung der mit UDP-[³H]Glc markierten Glycolipide von *T. gondii*

Mit UDP-[³H]Glc markierte Glycolipidextrakte wurden mit PI-PLC (B), GPI-PLD (C) und HNO₂ (D) behandelt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zwischen wassergesättigtem 1-Butanol und Wasser verteilt. Die organischen Phasen wurden auf DC-Platten im Laufmittelsystem B analysiert. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem Berthold DC-Scanner detektiert. Bild A zeigt den unbehandelten Glycolipidextrakt als Negativkontrolle. Dargestellt sind alle glucose-haltigen Glycolipide (I, II, IV und V). Mit der Lauffront migriert Dolichol-Phosphat-Glucose (DPG).

4.2.2.4 Analyse von Core-Glycanen

Auffällig war in mehreren Markierungsexperimenten ein Glycolipid mit sehr hydrophilen Eigenschaften bei ca. 3 cm (R_f -Wert 0,8; Abb. 22 A und Abb. 23 A, markiert jeweils mit x). Dieses Glycolipid tauchte sowohl bei Markierungen mit GDP- ^3H Man, als auch bei Markierungen mit UDP- ^3H GalNAc und UDP- ^3H Glc auf. Seine Sensitivität gegenüber verschiedenen spezifischen Spaltungen (PI-PLC, GPI-PLD und HNO_2) weist es als GPI aus. Um zu untersuchen, ob die hydrophileren Laufeigenschaften gegenüber dem Glycolipid I auf einem Unterschied in der Fettsäurezusammensetzung oder eventuell auf einer zusätzlichen Modifikation des hydrophilen Anteils des GPIs beruht, wurden neutrale Core-Glycane hergestellt. Dazu wurden die Phosphodiesterbindungen zwischen dem Ethanolamin und den Mannosen des Core-Glycans sowie zwischen dem Inositol und der hydrophoben Komponente durch Reaktion mit wässriger Flußsäure gespalten. Anschließend wurden die Proben mit salpetriger Säure behandelt und reduziert. Dabei wird das Glucosamin deaminiert, zu Anhydromannitol umgelagert und das Inositol abgespalten. Nach Dephosphorylierung, Deaminierung und Reduktion wurden die Core-Glycane über Mischbettionentauscher entsalzt, filtriert und abschließend durch "high-pH-anion-exchange-chromatography" (HPAEC) an einer Dionex-BioLC-Anlage analysiert. Unter den Bedingungen dieser HPAEC werden Oligosaccharide sehr spezifisch aufgrund geringster Strukturunterschiede getrennt. Zusätzlich wurden die Core-Glycane auf einer Bio-Gel P4-Gelfiltrationssäule analysiert, um ihre Größe zu bestimmen. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Dionex- und Bio-Gel P4-Analysen dargestellt. Es wurden jeweils Gesamtextrakte einer GDP- ^3H Man- (Abb. 25 A + B) und einer UDP- ^3H Glc-Markierung (Abb. 25 C + D) dephosphoryliert, deaminiert und reduziert. Die Core-Glycane der mit GDP- ^3H Man markierten Glycolipide I, II, IV und VI eluieren nach Bio-Gel P4-Chromatographie bei 7,0 Glucoseeinheiten (GU), die der Glycolipide III und VI bei 6,0 GU (Abb. 25 B). Die endständige Glucose bewirkt den Unterschied zwischen diesen beiden Core-Glycanen. Nach Dionex-HPAEC erscheinen beide Glycane trotz des Unterschiedes einer Glucose an derselben Position bei 3,0 Dionexeinheiten (DU Abb. 25 A). Das Core-Glycan von Man_3 -AHM (M_3) eluiert nach Bio-Gel P4-Säule bei 4,2 GU und nach HPAEC bei 2,5 DU, das Core-Glycan von Man_1 -AHM (M_1) bei 1,8 GU bzw. 1,1 DU. Das Core-Glycan von Man_2 -AHM (M_2) ist in diesen Analysen nicht nachgewiesen. Die Core-Glycane der mit UDP- ^3H Glc markierten GPIs I, II, IV und V eluieren auf der Bio-Gel P4-Säule ebenfalls bei 7,0 GU und auf der Dionex-HPAEC bei 3,0 DU (Abb. 25 C + D). Die Glycananteile der GPIs III und VI sind nicht mit UDP- ^3H Glc markierbar und daher auch nicht sichtbar. Kleinere Fragmente von 3,4 und 1,6 GU bzw. 2,0 und 0,4 DU sind unspezifische Spaltprodukte der HF- und HNO_2 -Behandlungen. Vermutlich handelt es sich um die abgespaltene Seitenkette, bestehend aus $\text{GalNAc}\alpha 1\text{-4Glc}$, und um freie Glucose.

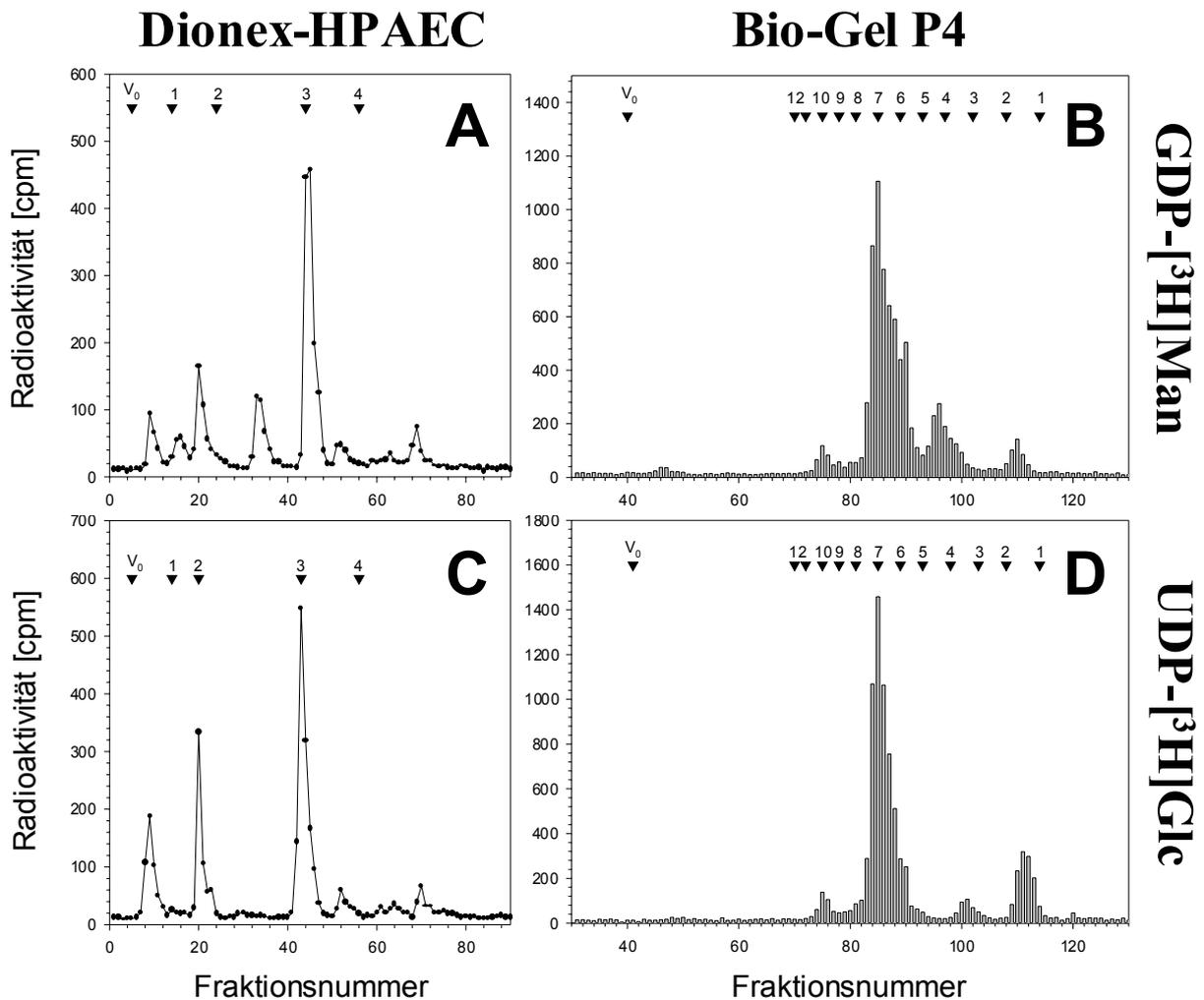


Abb. 25: Untersuchung neutraler Core-Glycane von *T. gondii*-GPIs nach HF-Spaltung

Core-Glycane wurden aus GDP-[³H]Man- (A+B) und UDP-[³H]Glc- (C+D) markierten Glycolipidextrakten von *T. gondii* dargestellt. Die entsalzten Core-Glycane wurden auf Dionex-HPAEC (A+C) und Bio-Gel P4 (B+D) analysiert. In der Bio-Gel P4-Analyse erscheinen die Core-Glycane der Glycolipide I, II, IV und V bei 7,0 GU (glucose-haltig), die Glycolipide III und VI bei 6,0 GU (keine Glucose, daher nur in B sichtbar). In der Dionex-HPAEC-Analyse erscheinen die Core-Glycane der Glycolipide I-VI alle bei 3,0 DU. Weiterhin wurden Core-Glycane von Man₃-AHM (4,2 GU / 2,5 DU) und Man₁-AHM (1,8 GU / 1,1 DU) nachgewiesen. Ein bisher nicht charakterisiertes Fragment eluiert bei 10,0 GU bzw. 3,7 DU. DU = Dionex-Einheiten, GU = Glucose-Einheiten.

In allen Diagrammen erscheint ein zusätzliches Fragment von 10,0 GU (Bio-Gel P4-Analyse, Abb. 25 B + D) bzw. 3,7 DU (Dionex-HPAEC, Abb. A + C). Dieses Core-Glycan stammt von dem oben erwähnten, bisher nicht beschriebenen Glycolipid. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein GPI mit zusätzlicher Modifikation existiert. Eine nähere Charakterisierung dieses GPIs wurde wegen des geringen Anteils am Gesamtmaterial nicht vorgenommen.

4.3 Untersuchungen zur Topologie der GPI-Anker-Biosynthese

Um die Topologie der GPI-Anker-Biosynthese zu untersuchen, wurde, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, ein System permeabilisierter *T. gondii*-Zellen etabliert. Toxoplasmen wurden aus ihren Wirtszellen freigesetzt und anschließend gereinigt. Die vom Wirtszellmaterial befreiten Toxoplasmen wurden hypoton aufgeschlossen und mit einem Homogenisator nach Dounce (tight fitting) homogenisiert. Die permeabilisierten Parasiten wurden mit dem gewünschten Radionukleotidzucker (UDP-[³H]GlcNAc, GDP-[³H]Man, UDP-[³H]GalNAc oder UDP-[³H]Glc), ATP, CoA und den jeweils fehlenden nichtradioaktiven Nukleotidzuckern versehen und für 90-120 min bei 37 °C inkubiert. Die radioaktive Markierung wurde durch Platzieren auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Parasiten für 30 min auf Eis mit PI-PLC (aus *B. thuringiensis*) behandelt. Die PI-PLC-Behandlung wurde durch Zugabe von 6,7 Volumenanteilen C/M 1:1 gestoppt und die Glycolipide in einem Schritt extrahiert. Durch die Behandlung mit PI-PLC sollen eventuell auf der cytoplasmatischen Seite des ER vorhandene GPIs abgespalten werden. Voraussetzung dafür ist zum einen, daß die Phospholipase die Zellmembran des Parasiten passieren kann (siehe 4.1.8), zum anderen, daß die ER-Membran intakt bleibt (siehe 4.1.9) und im Lumen des ER vorhandene GPIs vor dem PI-PLC-Verdau geschützt bleiben. Nicht gespaltene GPIs gelangen bei der Phasenverteilung zwischen wassergesättigtem Butanol und Wasser in die organische Phase. In der Wasserphase befinden sich die eventuell gespaltenen, radioaktiv markierten Zuckeranteile.

4.3.1 Untersuchung früher GPI-Biosyntheseintermediate (UDP-[³H]GlcNAc-Markierung)

Wie oben beschrieben wurden freie Toxoplasmen hypoton permeabilisiert und mit UDP-[³H]GlcNAc radioaktiv markiert. Die Inkubation erfolgte in Inkubationspuffer A (ohne Mn²⁺, mit 8 mM EDTA), um die Mannosylierung zu verhindern und nur frühe Biosyntheseintermediate zu erhalten. Nach der radioaktiven Markierung (90 min, 37 °C) erfolgte die PI-PLC-Behandlung (30 min auf Eis). Parallelansätze wurden nur mit PI-PLC-Puffer, aber ohne Enzym inkubiert (Negativkontrolle). Ansätze zur Positivkontrolle wurden in Gegenwart von 0,1% Triton X-100 mit PI-PLC behandelt. Durch die Zugabe des Detergenz werden Membranstrukturen zerstört und damit alle synthetisierten GPI-Intermediate zugänglich für die Phospholipase. Anschließend wurden die verbliebenen Glycolipide dreimal mit C/M/W 10:10:3 in einem Schritt extrahiert und mittels Phasenverteilung gereinigt. Aliquots von ¹/₁₀₀ jeder Butanolphase wurden zunächst mit dem Szintillationszähler analysiert. Da jedoch gezeigt wurde, daß nach Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc ein PI-PLC insensitive GPI entsteht (s. 4.2.2.1), liefert die Bestimmung der gesamten eingebauten Radioaktivität nur einen ersten Anhaltspunkt für die Zugänglichkeit der GPIs für PI-PLC.

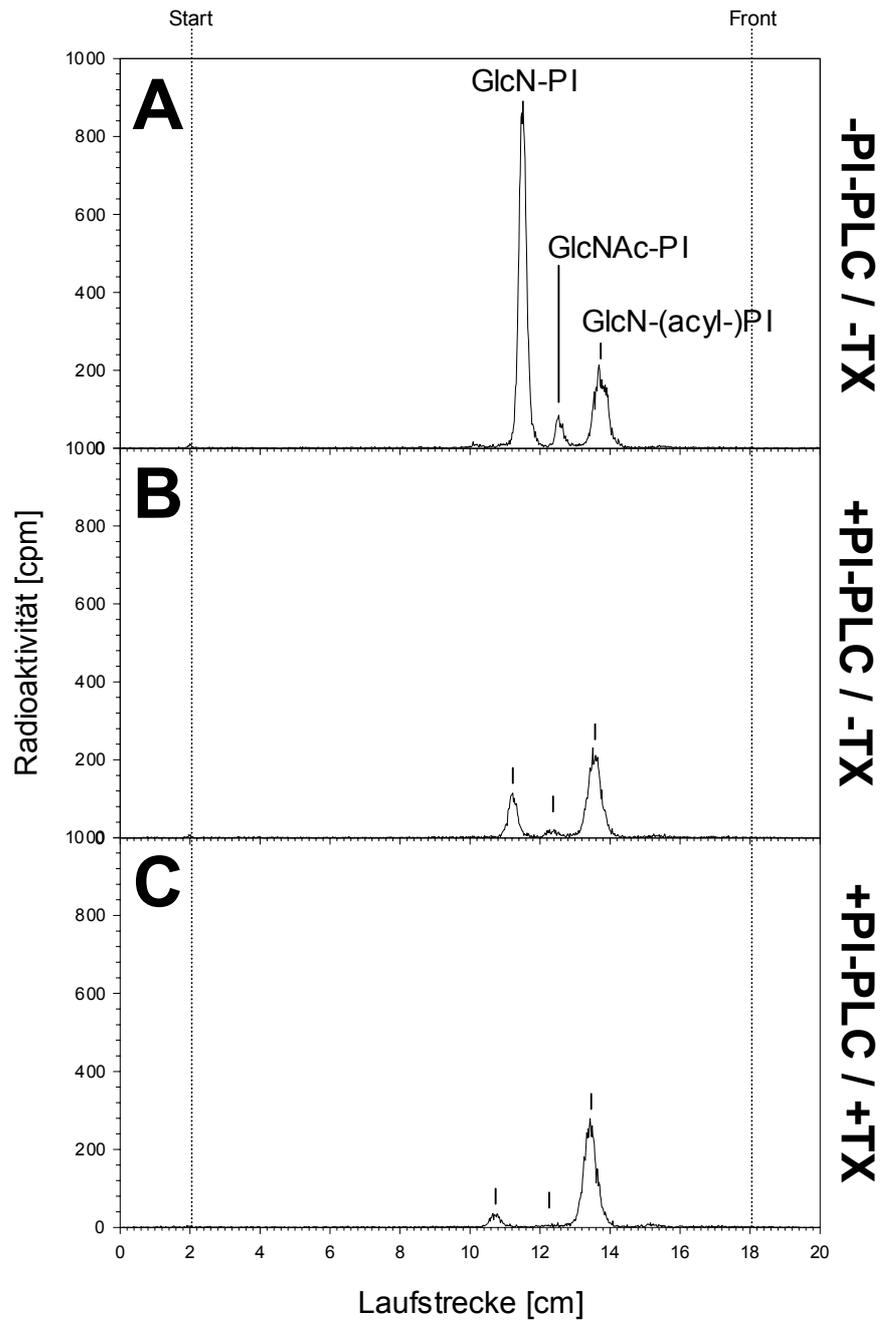


Abb. 26: PI-PLC-Behandlung an permeabilisierten Toxoplasmen nach UDP-[³H]GlcNAc-Markierung

Hypoton permeabilisierte Toxoplasmen wurden mit UDP-[³H]GlcNAc markiert und anschließend mit PI-PLC behandelt. Nach der Inkubation wurden die verbliebenen Glycolipide extrahiert, gewaschen und die organischen Phasen auf DC-Platten im Laufmittelsystem A analysiert. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem Berthold DC-Scanner detektiert. Bild A zeigt den unbehandelten Glycolipidextrakt als Negativkontrolle. Durch die Behandlung mit PI-PLC konnten 87% von GlcN-PI und 68% von GlcNAc-PI gespalten werden (B). Bei der Behandlung in Anwesenheit eines Detergenz (0,1% Triton X-100) konnten 96% (+ 9%) bzw. 91% (+ 23%) gespalten werden (C). Ein Intermediat mit acyliertem Inositol (GlcN-(acyl-)PI) ist insensitive gegenüber PI-PLC und dient daher als interner Standard. TX = Triton X-100.

Um eine Aussage zu einzelnen GPIs treffen zu können, wurden die Butanolphasen getrocknet und alle Proben in der DC analysiert. Dazu wurden ca. 10.000 cpm der Negativkontrolle und gleiche Probenvolumina (entsp. gleiches Parasitenäquivalent) der übrigen Proben auf die DC-Platte aufgetragen und in Laufmittelsystem A entwickelt. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit dem Berthold DC-Platten-Scanner gemessen und einzelne Glycolipide mit dem dazugehörigen Programm quantifiziert. Abbildung 26 zeigt die Radioaktivitätsprofile eines beispielhaften Versuches. In Abbildung 26 A ist die Negativkontrolle ohne Einsatz von PI-PLC gezeigt. Deutlich erkennbar sind die unter 4.2.2 beschriebenen drei Glycolipide: Die Hauptmenge der Radioaktivität (ca. 69%) wurde in das hydrophilste der drei GPIs, GlcN-PI, eingebaut. Der direkte Vorläufer GlcNAc-PI ist nur zu einem geringen Anteil markiert (ca. 6%), da die Deacetylierung zu GlcN-PI sehr schnell erfolgt. Das acylierte Intermediat GlcN-(acyl)-PI ist in dem dargestellten Versuch zu ca. 25% enthalten, was bedeutet, daß insgesamt ca. 75% des markierten Materials durch PI-PLC spaltbar sind. Der Anteil an GlcN-(acyl)-PI schwankt zwischen den verschiedenen Markierungsexperimenten sehr stark. Er kann Werte zwischen 15% und 60% vom gesamten radioaktiv markierten Material erreichen. Da GlcN-(acyl)-PI nicht PI-PLC spaltbar ist, wurde es als interner Standard zur Normalisierung der verschiedenen Ansätze innerhalb eines Markierungsexperimentes genutzt. Die Anteile von GlcNAc-PI und GlcN-PI in der Negativkontrolle wurden jeweils auf 100% gesetzt. Durch die Behandlung mit PI-PLC (Abb. 26 B) konnten in diesem Versuch 87% von GlcN-PI und 68% von GlcNAc-PI gespalten werden. Die hohe Spaltbarkeit dieser beiden Glycolipide in intakten Membranen zeigt, daß sie zugänglich für die Phospholipase und somit zur cytosolischen Seite des ER orientiert sind. Durch PI-PLC-Behandlung in Anwesenheit von Detergenz (Abb. 26 C) kann ein zusätzlicher Anteil dieser GPIs gespalten werden. Dieser beträgt 9% (insgesamt 96%) bei GlcN-PI und 23% (insgesamt 91%) bei GlcNAc-PI. Dies kommt vermutlich alleine dadurch zustande, daß durch den Einsatz des Detergenz die Glycolipide nicht mehr in der Membran verankert sind, sondern frei vorliegen und somit für das Enzym PI-PLC besser zugänglich sind. Dies gilt wohl in besonderem Maße für GlcNAc-PI. Hier kommt es beim membranverankerten GPI zur sterischen Behinderung der PI-PLC durch die Acetylgruppe. Die Ergebnisse aller Spaltungen nach UDP-[³H]GlcNAc-Markierung sind in Abbildung 27 zusammengefaßt: Durchschnittlich können von GlcN-PI $82,2 \pm 6,2\%$ und von GlcNAc-PI $70,7 \pm 6,2\%$ gespalten werden. In Anwesenheit von Detergenz können ca. 10% zusätzlich gespalten werden: GlcN-PI $92,5 \pm 2,9\%$ und GlcNAc-PI $81,6 \pm 7,5\%$. Diese Werte geben den unter den gewählten Bedingungen maximal spaltbaren Anteil des jeweiligen Glycolipids wieder.

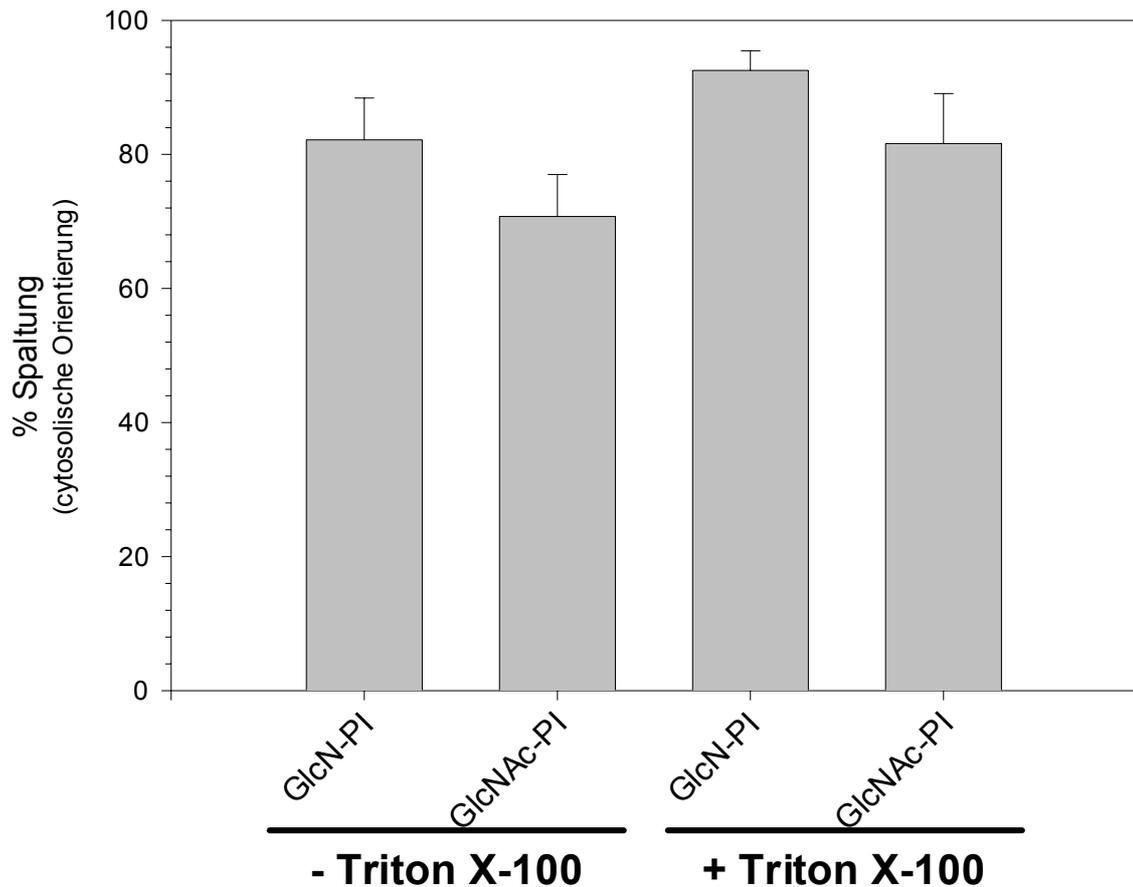


Abb. 27: Spaltungseffizienz UDP-[³H]GlcNAc-markierter Glycolipide nach PI-PLC-Behandlung an permeabilisierten Toxoplasmen

Die Ergebnisse von 28 wie unter Abb. 26 beschriebener Versuche wurden zusammengefaßt und die Spaltungseffizienz der Glycolipide berechnet. Dazu wurden die einzelnen Glycolipide integriert und die Werte der Negativkontrolle jeder Versuchsreihe auf 100% gesetzt. Glc-(acyl)-PI wurde wegen seiner Insensitivität gegenüber PI-PLC als interner Standard zur Normalisierung genutzt. Die prozentuale Spaltung der Glycolipide wurde berechnet und die daraus resultierenden Mittelwerte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt (linke Hälfte, ohne Detergenz). So können von GlcN-PI $82,2 \pm 6,2\%$ und von GlcNAc-PI $70,7 \pm 6,2\%$ gespalten werden. Unter Einfluß eines Detergenz (0,1% Triton X-100) können von GlcN-PI $92,5 \pm 2,9\%$ und GlcNAc-PI $81,6 \pm 7,5\%$ gespalten werden (rechte Hälfte). GlcN-PI = Glucosamin-Phosphatidylinositol; GlcNAc-PI = *N*-Acetyl-Glucosamin-Phosphatidyl-inositol.

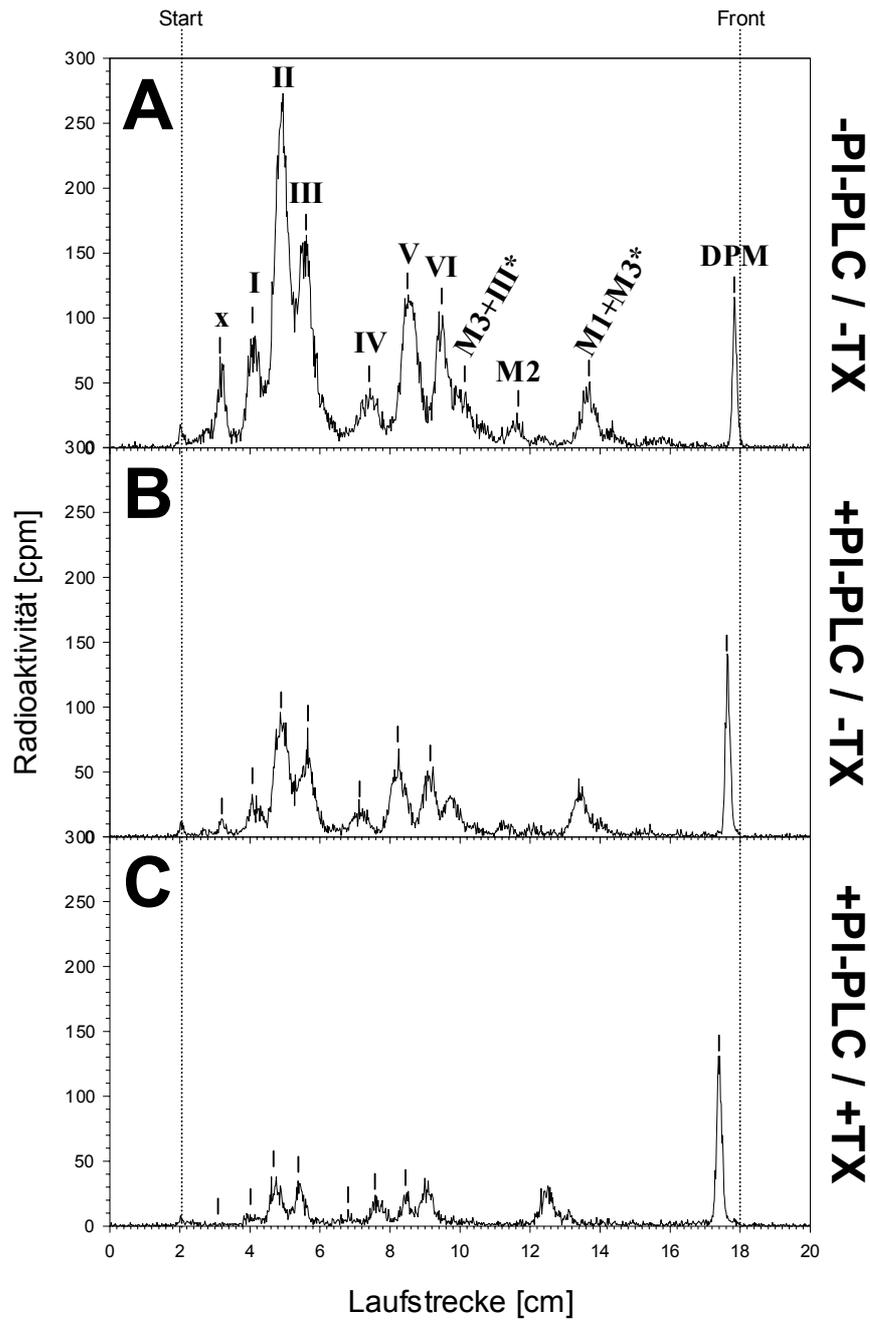


Abb. 28: PI-PLC-Behandlung an permeabilisierten Toxoplasmen nach GDP-[³H]Man-Markierung

Hypoton permeabilisierte Toxoplasmen wurden mit GDP-[³H]Man markiert und anschließend mit PI-PLC behandelt. Nach der Inkubation wurden die verbliebenen Glycolipide extrahiert, gewaschen und die organischen Phasen auf DC-Platten im Laufmittelsystem B analysiert. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem Berthold DC-Scanner detektiert. Bild A zeigt den unbehandelten Glycolipidextrakt als Negativkontrolle. Die Sensitivität der Glycolipide gegenüber der Behandlung mit PI-PLC (Bild B) ist ein Nachweis für ihre cytosolische Orientierung. Bild C zeigt die PI-PLC-Behandlung in Anwesenheit eines Detergenz (0,1% Triton X-100) zum Nachweis der im verwendeten System maximal spaltbaren Glycolipidmengen (Positivkontrolle). Dolichol-Phosphatmannose (DPM) ist insensitiv gegenüber PI-PLC und dient daher als interner Standard zur Normalisierung. TX = Triton X-100.

4.3.2 Untersuchung mannosylierter GPI-Biosyntheseintermediate (GDP- ^3H]Man-Markierung)

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen an Trypanosomen und einer Thy-1⁺ Mauszelllinie (Vidugiriene und Menon, 1993; 1994). Um nun die Verteilung der mannosylierten Intermediate zu untersuchen, wurde eine Markierung an hypoton permeabilisierten Parasiten mit GDP- ^3H]Man durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in Inkubationspuffer B (5 mM Mg²⁺, 5 mM Mn²⁺) für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurde wie unter 4.3.1 beschrieben die PI-PLC-Behandlung durchgeführt, die Glycolipide extrahiert, gereinigt und schließlich analysiert. Für die DC-Analyse wurde Laufmittelsystem B verwendet, es wurden ca. 20.000 cpm der Probe pro Spur für die Negativkontrolle und entsprechende Aliquots (gleiche Parasitenäquivalente) der anderen Proben eingesetzt. Abbildung 28 A zeigt das Radioaktivitätsprofil der GDP- ^3H]Man-markierten Negativkontrolle. Wie unter 4.2.2 beschrieben erhält man eine Vielzahl von Glycolipiden. Bei den am effektivsten markierten Lipiden handelt es sich um die bereits durch eine Seitenkette modifizierten Glycolipide I–VI. Die nicht modifizierten, mannosylierten Intermediate Man₁ bis Man₃ sind nur schwach markiert (1-9% des gesamten Materials) und können mit acylierten Intermediaten komigrieren (s. u.). Bei dem hydrophobsten, fast mit der Front migrierenden Glycolipid handelt es sich um Dolichol-Phosphat-Mannose (Dol-P-Man). Da es sich dabei um ein PI-PLC-insensitives Lipid handelt, kann es als interner Standard genutzt werden, um einzelne Ansätze innerhalb eines Experimentes zu normalisieren. Auch hier wird deutlich, daß ein Großteil der Glycolipide I-VI in permeabilisierten Zellen zugänglich für PI-PLC ist (zwischen 61% und 74%; Abb. 28 B), was bedeutet, daß sie auf der cytoplasmatischen Seite des ER präsent sind. In dem dargestellten Experiment ist auch das unter 4.2.2 erwähnte, bisher nicht beschriebene GPI x deutlich vorhanden, welches hier zu 87% gespalten werden kann. Einige der hydrophoberen, nicht modifizierten Glycolipide lassen sich nur zu einem geringen Anteil spalten: Man₃-GlcN-PI 43% und Man₁-GlcN-PI 38%. Dies liegt aber vor allem daran, daß hier PI-PLC-insensitives Material mit diesen beiden Glycolipiden komigriert. Diese acylierten Intermediate bleiben auch in Anwesenheit von Detergenz PI-PLC-resistent (Abb. 28 C). Die Spaltungseffizienz der modifizierten Glycolipide kann in Anwesenheit von Detergenz zum Teil deutlich erhöht werden (um 20-27%). Dies kommt zum einen daher, daß wie bereits unter 4.3.1 beschrieben die Zugänglichkeit der Moleküle verbessert ist, da sie nicht mehr in der Membran verankert sind. Zum anderen muß man davon ausgehen, daß sich ein Teil des Glycolipidpools auf der luminalen Seite der ER-Membran befindet und somit vor dem PI-PLC-Verdau geschützt ist. Erst das Zerstören der Membranintegrität durch Triton X-100 macht diesen Anteil zugänglich für die Phospholipase C. Abbildung 29 zeigt die Zusammenfassung von vier Experimenten nach GDP- ^3H]Man-Markierung.

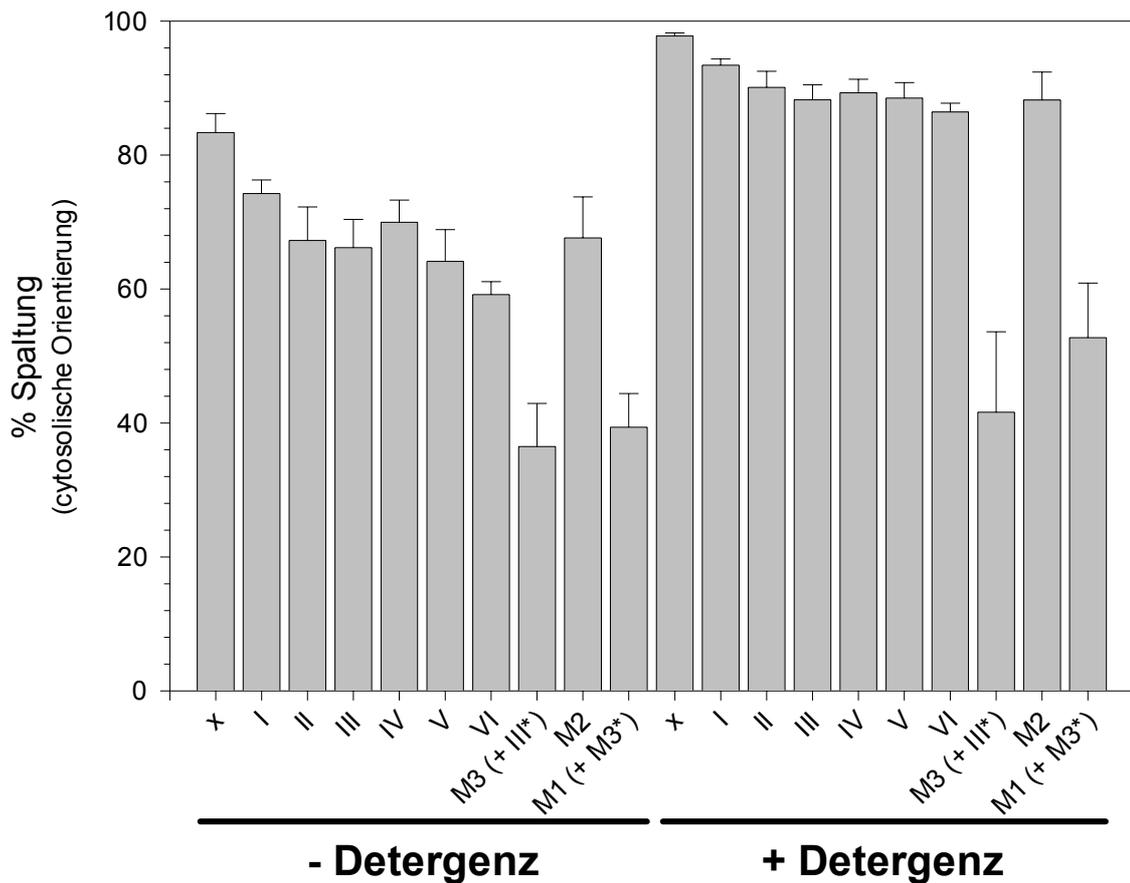


Abb. 29: Spaltungseffizienz GDP-[³H]Man-markierter Glycolipide nach PI-PLC-Behandlung an permeabilisierten Toxoplasmen

Die Ergebnisse von vier wie unter Abb. 28 beschriebener Versuche wurden zusammengefaßt und die Spaltungseffizienz der Glycolipide berechnet. Dazu wurden die einzelnen Glycolipide integriert und die Werte der Negativkontrolle jeder Versuchsreihe auf 100% gesetzt. Dol-P-Man wurde wegen seiner Insensitivität gegenüber PI-PLC als interner Standard zur Normalisierung genutzt. Die prozentuale Spaltung der Glycolipide wurde berechnet und die daraus resultierenden Mittelwerte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. Die linke Hälfte (ohne Detergenz) gibt die Anteile der Glycolipide mit cytosolischer Orientierung wieder, die rechte Hälfte (mit 0,1% Triton X-100) gibt die im verwendeten System maximal spaltbaren Glycolipidmengen (Positivkontrolle) an. x = bisher nicht charakterisiertes GPI x; I-VI = *T. gondii*-Glycolipide I-VI; M1-M3 = Man_{1,3}-GlcN-PI; * = Glycolipide mit acyliertem Inositol.

Die Glycolipide I-VI lassen sich zu einem Anteil zwischen 59,2 ± 1,9% (Glycolipid VI) und 74,3 ± 2,0% (Glycolipid I) spalten. Glycolipid x läßt sich zu einem Anteil von 83,4 ± 2,8% spalten. Auffällig ist die geringe Spaltbarkeit der Intermediate Man₃-GlcN-PI (36,5 ± 6,4%) und Man₁-GlcN-PI (39,4 ± 5,0%). Dies könnte darauf deuten, daß ein Großteil des Materials im Lumen des ER vor dem PI-PLC-Verdau geschützt ist. Dagegen spricht jedoch, daß auch in Anwesenheit von Detergenz 58,4% (Bereich von Man₃-GlcN-PI) bzw. 47,3% (Bereich von Man₁-GlcN-PI) nicht gespalten werden können. Die Erhöhung der Spaltungseffizienz im Bereich von Man₃-GlcN-PI ist mit 5,1% auch nicht signifikant (p = 0,48). Dies macht deutlich, daß sich im Bereich dieser

beiden Glycolipide Material befindet, welches PI-PLC-insensitiv ist. Aufgrund der Laufeigenschaften auf der DC und dem Vergleich mit *T. brucei*-Standard läßt sich dem Bereich Man₃-GlcN-PI die acylierte Form von Glycolipid III (EtN-Man₃-(GalNAc)-PI) und dem Bereich Man₁-GlcN-PI die acylierte Form von Man₃-GlcN-PI zuordnen. Die Spaltungseffizienz der übrigen Glycolipide wird durch den Einsatz von Detergenz im Durchschnitt um ca. 21% signifikant erhöht ($4,2 \times 10^{-7} < p < 1,4 \times 10^{-3}$). Wie bereits oben erwähnt, deutet dies darauf hin, daß sich ein Teil der jeweiligen Intermediate auf der luminalen Seite des ER befindet, der größere Teil jedoch cytosolisch orientiert ist.

4.3.3 Untersuchung modifizierter GPI-Biosyntheseintermediate (UDP-[³H]Glc-Markierung)

Da das Glycolipid-Spektrum nach Markierung mit GDP-[³H]Man durch die große Anzahl von Intermediaten und die Anwesenheit von acylierten Produkten sehr komplex ist, wurde durch die radioaktive Markierung mit UDP-[³H]Glc ein fokussierter Blick auf die glucose-haltigen Glycolipide geworfen. Die Inkubation hypoton permeabilisierter Parasiten mit UDP-[³H]Glc erfolgte in Inkubationspuffer B (5 mM Mg²⁺, 5 mM Mn²⁺) für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurde wie unter 4.3.1 beschrieben die PI-PLC-Behandlung durchgeführt, die Glycolipide extrahiert, gereinigt und schließlich analysiert. Für die DC-Analyse wurde Laufmittelsystem B verwendet, es wurden ca. 10.000 cpm pro Spur für die Negativkontrolle und entsprechende Aliquots (gleiche Parasitenäquivalente) der anderen Proben eingesetzt. Durch die Wahl dieses Nukleotidzuckers können gezielt nur die Glycolipide I, II, III und IV radioaktiv markiert werden (Abb. 30 A). Es tritt zwar auch Dol-P-Glc als Produkt auf, dieses wird jedoch nicht als Donor für die GPI-Biosynthese verwendet (Striepen *et al.*, 1999). Da es wie GlcN-(acyl)-PI und Dol-P-Man PI-PLC-insensitiv ist, kann es ebenfalls als interner Standard dienen, um verschiedene Ansätze innerhalb eines Markierungsexperimentes zu normalisieren. Ebenfalls mit UDP-[³H]Glc markierbar ist das Glycolipid x (s. a. 4.2.2), welches mit in die Untersuchungen einbezogen wurde. Sowohl nach Behandlung mit PI-PLC als auch nach Zerstörung des Membransystems durch Zugabe von Detergenz (0,1% Triton X-100, Abb. 30 C) zeigt sich an den permeabilisierten Zellen (Abb. 30 B) ein sehr ähnliches Bild wie bei den analogen Versuchen nach GDP-[³H]Man-Markierung (vgl. 4.3.2): Dem Großteil der markierten Glycolipide kann aufgrund der Zugänglichkeit für das Enzym in permeabilisierten Zellen eine cytosolische Orientierung zugeordnet werden. Ein Teil des Materials bleibt vor der Spaltung geschützt und wird erst nach Detergenz-Zugabe erreichbar für PI-PLC. Betrachtet man die Zusammenfassung von fünf Experimenten, so sieht man an permeabilisierten Parasiten (Abb. 31, linke Hälfte) für die Glycolipide I, II, IV und V eine Spaltungseffizienz zwischen $60,8 \pm 11,8\%$ (Glycolipid V) und $74,6 \pm 5,8\%$ (Glycolipid I). Glycolipid x läßt sich hier nur zu einem Anteil von $73,2 \pm 9,4\%$ spalten.

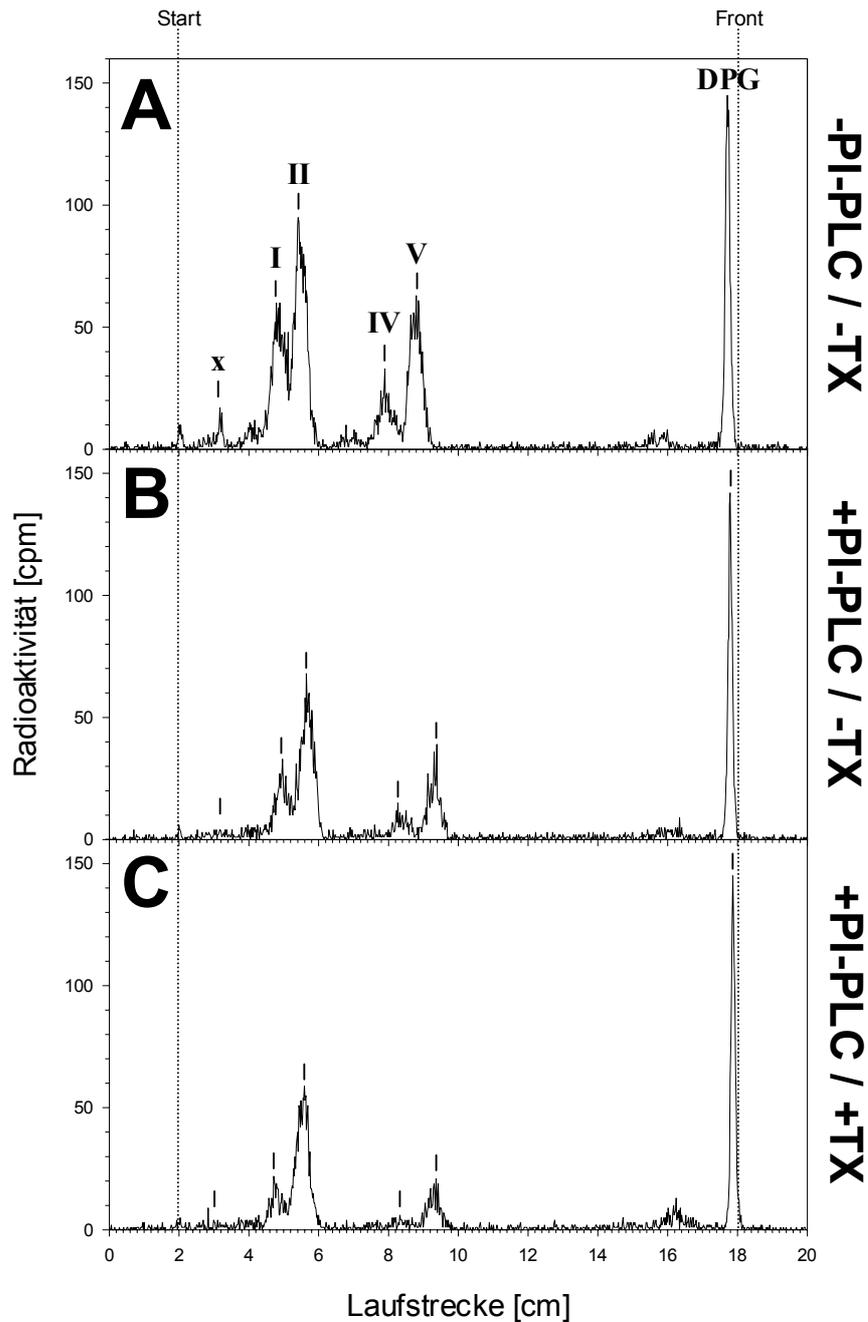


Abb. 30: PI-PLC-Behandlung an permeabilisierten Toxoplasmen nach UDP-[³H]Glc-Markierung

Hypoton permeabilisierte Toxoplasmen wurden mit UDP-[³H]Glc markiert und anschließend mit PI-PLC behandelt. Nach der Inkubation wurden die verbliebenen Glycolipide extrahiert, gewaschen und die organischen Phasen auf DC-Platten im Laufmittelsystem B analysiert. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit einem Berthold DC-Scanner detektiert. Bild A zeigt den unbehandelten Glycolipidextrakt als Negativkontrolle. Die Sensitivität der Glycolipide gegenüber der Behandlung mit PI-PLC (Bild B) ist ein Nachweis für ihre cytosolische Orientierung. Bild C zeigt die PI-PLC-Behandlung in Anwesenheit eines Detergenz (0,1% Triton X-100) zum Nachweis der im verwendeten System maximal spaltbaren Glycolipidmengen (Positivkontrolle). Dolichol-Phosphatglucose (DPG) ist insensitiv gegenüber PI-PLC und dient daher als interner Standard zur Normalisierung. TX = Triton X-100.

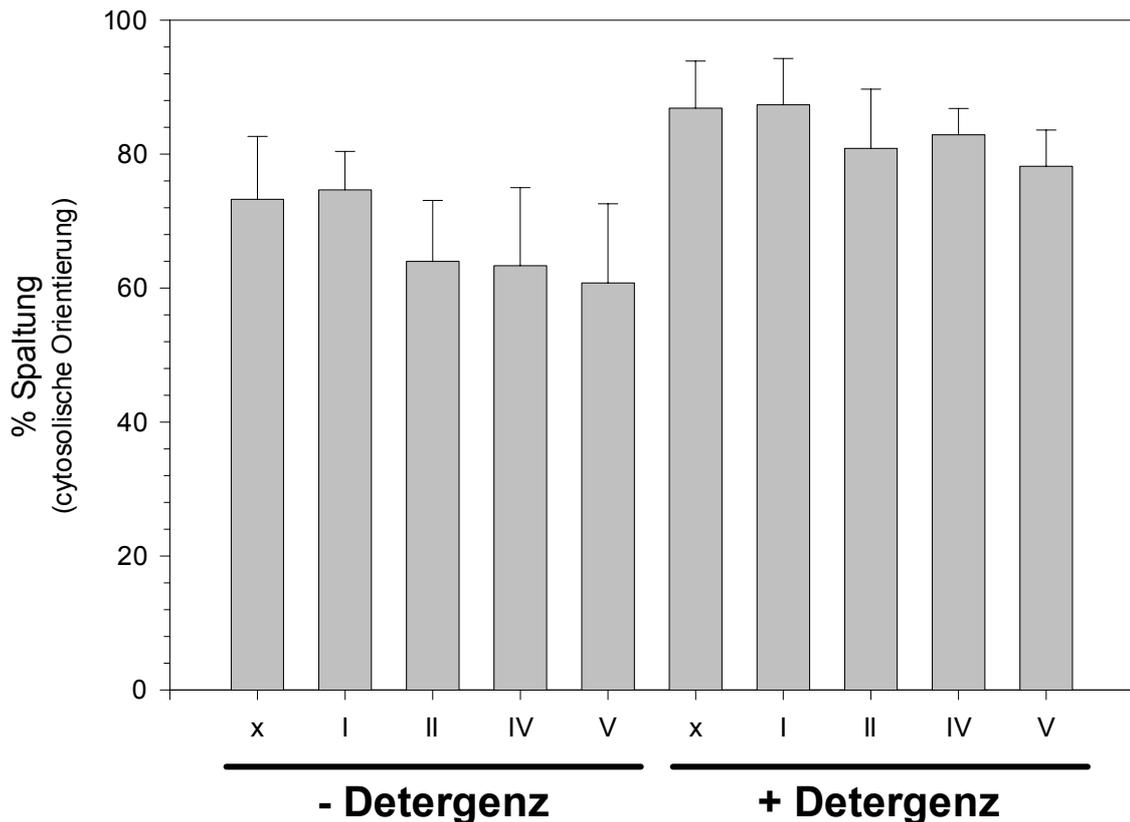


Abb. 31: Spaltungseffizienz UDP-[³H]Glc-markierter Glycolipide nach PI-PLC-Behandlung an permeabilisierten Toxoplasmen

Die Ergebnisse von fünf wie unter Abb. 30 beschriebener Versuche wurden zusammengefaßt und die Spaltungseffizienz der Glycolipide berechnet. Dazu wurden die einzelnen Glycolipide integriert und die Werte der Negativkontrolle jeder Versuchsreihe auf 100% gesetzt. Dol-P-Glc wurde wegen seiner Insensitivität gegenüber PI-PLC als interner Standard zur Normalisierung genutzt. Die prozentuale Spaltung der Glycolipide wurde berechnet und die daraus resultierenden Mittelwerte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. Die linke Hälfte (ohne Detergenz) gibt die Anteile der Glycolipide mit cytosolischer Orientierung wieder, die rechte Hälfte (mit 0,1% Triton X-100) gibt die im verwendeten System maximal spaltbaren Glycolipidmengen (Positivkontrolle) an. x = bisher nicht charakterisiertes GPI x; I, II, IV, V = *T. gondii*-Glycolipide I, II, IV und V.

In Anwesenheit von 0,1% Triton X-100 (Abb. 31, rechte Hälfte) kann die Spaltungseffizienz um durchschnittlich ca. 16% signifikant ($0,01 < p < 0,03$) erhöht werden. Auch hier deutet dies darauf hin, daß sich ein Teil der jeweiligen Intermediate auf der luminalen Seite des ER befindet, der größere Teil jedoch cytosolisch orientiert ist. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen nach GDP-[³H]Man- und UDP-[³H]Glc-Markierung miteinander, so stellt man allerdings fest, daß die Spaltungseffizienz nach UDP-[³H]Glc-Markierung im Durchschnitt um 6,6% niedriger liegt, als bei den vergleichbaren Versuchen mit GDP-[³H]Man. Diese Abweichungen sind jedoch größtenteils nicht signifikant. So liefert der Vergleich der Ergebnisse an permeabilisierten Zellen p-Werte zwischen 0,08 (Glycolipid x) und 0,90 (Glycolipid I).

Für die PI-PLC-Behandlung unter Detergenz-Bedingungen sind die Abweichungen für die Glycolipide I ($p = 0,13$) und II ($p = 0,08$) ebenfalls nicht signifikant, für die Glycolipide x, IV und V sind die Abweichungen jedoch signifikant ($0,01 < p < 0,02$). Für alle glucose-markierbaren Glycolipide sind die Ergebnisse aus 4.3.2 und 4.3.3 in Abbildung 32 zusammengefaßt. Die Spaltungseffizienz der einzelnen Glycolipide bewegt sich zwischen $62,3 \pm 9,0\%$ (Glycolipid V) und $77,7 \pm 8,7\%$ (Glycolipid x). In Anwesenheit des Detergenz steigt die Spaltungseffizienz um durchschnittlich 17,8% auf Werte von $82,8 \pm 6,8\%$ (Glycolipid V) und $91,7 \pm 7,6\%$ (Glycolipid x) signifikant an. Insgesamt läßt sich also festhalten, daß der überwiegende Anteil der einzelnen Glycolipide auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran präsent ist, aber ein Teil des GPI-Pools auf der luminalen Seite zu finden ist.

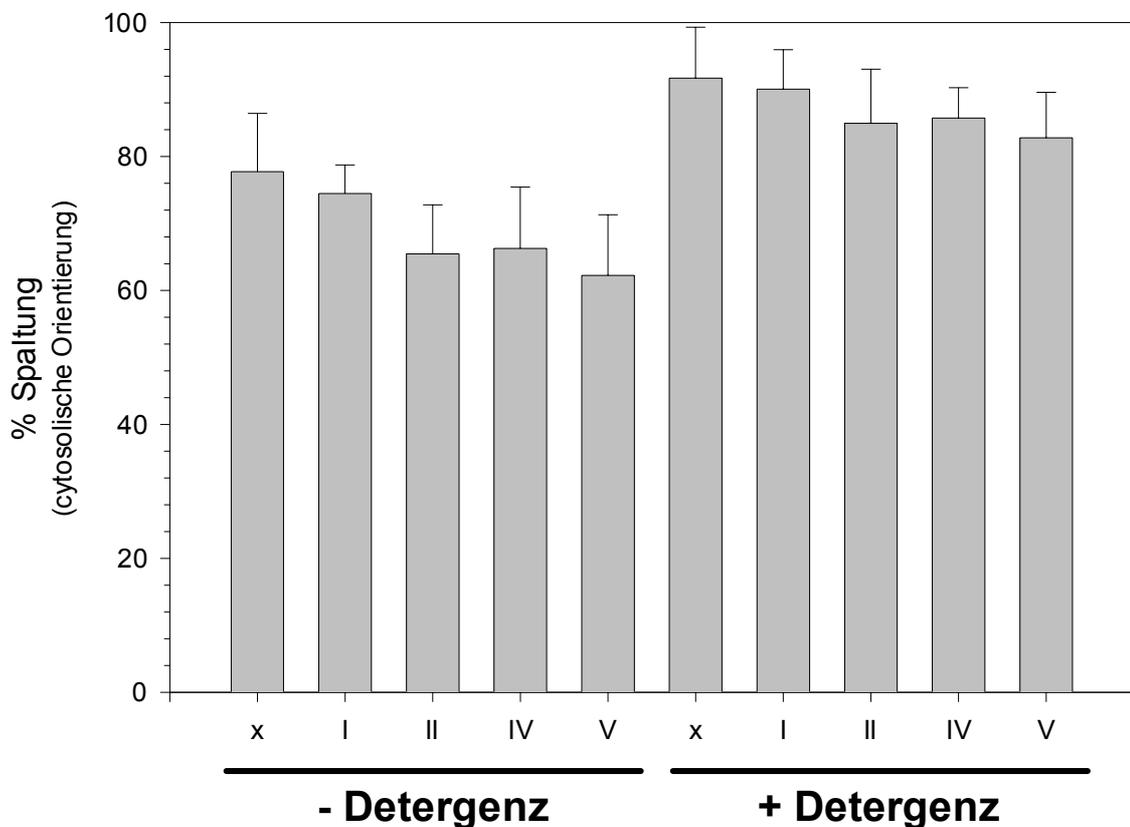


Abb. 32: PI-PLC-Behandlung an permeabilisierten Toxoplasmen – Zusammenfassung der Ergebnisse nach GDP-³H]Man- und UDP-³H]Glc-Markierung

Die Ergebnisse der PI-PLC-Behandlungen an permeabilisierten Toxoplasmen nach Markierung mit GDP-³H]Man (Abb. 29) und UDP-³H]Glc (Abb. 31) aller glucose-markierbaren Glycolipide (Glycolipide x, I, II, IV und V) wurden zusammengefaßt (neun Experimente) und die Mittelwerte der einzelnen Spaltungseffizienzen gebildet. Die linke Hälfte (ohne Detergenz) gibt die Anteile der Glycolipide mit cytosolischer Orientierung wieder, die rechte Hälfte (mit 0,1% Triton X-100) gibt die im verwendeten System maximal spaltbaren Glycolipidmengen (Positivkontrolle) an. x = bisher nicht charakterisiertes GPI x; I, II, IV, V = *T. gondii*-Glycolipide I, II, IV und V.

4.4 Die Glycolipide von *T. gondii* und ihre Orientierung in der ER-Membran – eine Zusammenfassung

Tabelle 2 faßt alle Ergebnisse der Abschnitte 4.2 und 4.3 zusammen. Zusätzlich wurden Ergebnisse aus einer Zusammenarbeit mit Dr. Terry Smith, Dundee, Schottland, aufgenommen. GlcNAc-PI entsteht durch die Übertragung von GlcNAc auf PI (Donor ist UDP-[³H]GlcNAc), dieses Produkt wird sehr schnell zu GlcN-PI deacetyliert. Anschließend erfolgt die Übertragung einer zusätzlichen Fettsäure an das Inositol, es entsteht GlcN-(acyl)-PI. Diese Intermediate sind bei *in vivo*-Markierungen mit [³H]GlcN nicht nachweisbar, da die Umsetzung zu den mannosylierten Folgeprodukten sehr schnell erfolgt. Bei der Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc im sogenannten zellfreien System erhält man diese Produkte auch nur, wenn die Mannosylierung inhibiert wird. Durch Weglassen von Mn²⁺ und Mg²⁺ und Zugabe von EDTA im Reaktionsansatz akkumulieren vor allem die beiden Intermediate GlcN-PI und GlcN-(acyl)-PI. Die Existenz acylierter Intermediate wurde schon seit längerem diskutiert (Tomavo *et al.*, 1992c; Striepen *et al.*, 1997), der eindeutige Nachweis gelang erst jetzt. In Zusammenarbeit mit Dr. Terry Smith konnte gezeigt werden, daß die Acylierung durch PMSF inhibierbar ist (Manuskript in Vorbereitung).

In Anwesenheit von Mn²⁺ und Mg²⁺ erfolgt dann die schrittweise Übertragung von drei Mannosen mit Dolichol-P-Mannose als Donor. Es treten sowohl am Inositol acylierte, als auch nicht-acylierte Intermediate auf. Möglicherweise findet, ähnlich wie im *T. brucei*-System, parallel zu den Mannosylierungsschritten eine Acylierung und Deacylierung des Inositols statt (Güther *et al.*, 1994; Güther und Ferguson, 1995; Smith *et al.*, 1999). Auftretende acylierte Intermediate sind dabei unempfindlich gegenüber der Behandlung mit PI-PLC, wodurch die Untersuchung der Topologie erschwert wird. Für das Intermediat Man1-GlcN-PI beispielsweise wurde ein Anteil von 39,4% mit cytosolischer Orientierung bestimmt. Dieser Wert fällt im Vergleich zu den anderen Werten niedriger aus, da Man1-GlcN-PI auf der DC mit Man₃-GlcN-(acyl)-PI komigriert.

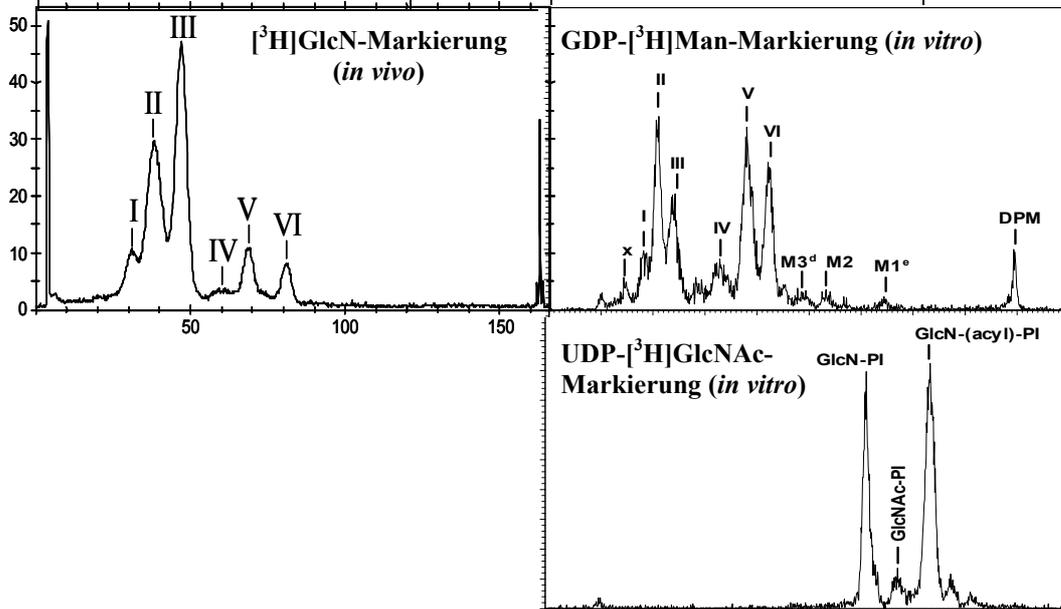
Schließlich sind die bereits von B. Striepen (1999) beschriebenen *T. gondii*-Glycolipide I-VI zu finden. Diese Glycolipide entstehen durch die Übertragungen von *N*-Acetyl-Galactosamin, Glucose und Ethanolamin-Phosphat. Die Glycolipide I-III sind dabei die Intermediate jeweils mit Ethanolamin und die Glycolipide IV-VI die Intermediate ohne Ethanolamin. Die Glycolipide I bzw. IV stellen die *lyso*-Formen der Glycolipide II bzw. V dar.

Zusätzlich wurde ein Glycolipid x als GPI identifiziert, welches eine zusätzliche hydrophile, nicht säurelabile Modifikation am Core-Glycan trägt. Aufgrund der geringen Menge dieses Intermediates an der Gesamtmenge der GPIs konnte keine eingehendere Charakterisierung durchgeführt werden.

Tab. 2: GPIs von *T. gondii* und ihre Orientierung in der ER-Membran

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Teilen 4.2 und 4.3 zur Charakterisierung der *T. gondii*-Glycolipide und ihrer Orientierung in der Lipiddoppelschicht der ER-Membran. ^a: nicht charakterisierte Modifikation; ^b: Laufunterschiede zu *in vivo* auf der DC aufgrund anderer Fettsäurezusammensetzung von PI; ^c: akkumuliert in Anwesenheit von PMSF/DFP bei Markierung mit [³H]GlcN; ^d: komigriert mit acylierter Form von Glycolipid III; ^e: komigriert mit acylM₃; ND: aufgrund von PI-PLC-Resistenz nicht feststellbar

<i>in vivo</i>	Glycolipid	<i>in vitro</i>	% cytopl.	% luminal
	X ^a	EtN-Man ₃ -(x ^a)-(GalNAc-Glc)-GlcN-PI ^b	77,7	22,3
<i>lyso</i> -EtN-Man ₃ -(GalNAc-Glc)-GlcN-PI	I	<i>lyso</i> -EtN-Man ₃ -(GalNAc-Glc)-GlcN-PI ^b	74,5	25,5
EtN-Man ₃ -(GalNAc-Glc)-GlcN-PI	II	EtN-Man ₃ -(GalNAc-Glc)-GlcN-PI ^b	65,4	34,6
EtN-Man ₃ -(GalNAc)-GlcN-PI	III	EtN-Man ₃ -(GalNAc)-GlcN-PI ^b	66,2	33,8
<i>lyso</i> -Man ₃ -(GalNAc-Glc)-GlcN-PI	IV	<i>lyso</i> -Man ₃ -(GalNAc-Glc)-GlcN-PI ^b	66,3	33,7
Man ₃ -(GalNAc-Glc)-GlcN-PI	V	Man ₃ -(GalNAc-Glc)-GlcN-PI ^b	62,3	37,7
Man ₃ -(GalNAc)-GlcN-PI	VI	Man ₃ -(GalNAc)-GlcN-PI ^b	59,2	40,8
Man ₃ -GlcN-(acyl)-PI ^c	acylM ₃	Man ₃ -GlcN-(acyl)-PI	ND	ND
	M ₃ ^d	Man ₃ -GlcN-PI	36,5 ^d	63,5
	acylM ₂	Man ₂ -GlcN-(acyl)-PI	ND	ND
	M ₂	Man ₂ -GlcN-PI	67,6	32,4
	acylM ₁	Man ₁ -GlcN-(acyl)-PI	ND	ND
	M ₁ ^e	Man ₁ -GlcN-PI	39,4 ^e	60,6
		GlcN-(acyl)-PI	ND	ND
		GlcN-PI	82,2	17,8
		GlcNAc-PI	70,7	29,3



5 Diskussion

Um die Verteilung und Orientierung der GPI-Biosyntheseintermediate in dem Parasiten *T. gondii* zu untersuchen, erschien es am geeignetsten, ein System aus permeabilisierten Zellen zu etablieren. Durch in die Zellmembran eingebrachte Löcher sollte dann PI-PLC in die zu untersuchenden Zellen eingebracht werden. Dieses Enzym ist in der Lage, membranständige GPI-Moleküle zu spalten, also auch eventuell an der ER-Membran gebildete GPI-Intermediate. Um jedoch zwischen einer Orientierung der GPIs an der cytoplasmatischen oder luminalen Seite des ER zu unterscheiden, mußte gewährleistet sein, daß PI-PLC nicht in das Lumen des ER eindringen kann. Das bedeutet, ein System permeabilisierter Zellen muß zwei Grundvoraussetzungen erfüllen: Zum einen müssen in der Zellmembran Löcher entstehen, die für Moleküle von mindestens 34 kDa (PI-PLC) durchlässig sind, zum anderen müssen Zellkompartimente, hier vor allem das ER, intakt bleiben. Ein solches System konnte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit etabliert werden. Die von diesem System synthetisierten GPIs wurden identifiziert und charakterisiert, um die Strukturen mit bekannten Daten abzugleichen. Insbesondere wurden die permeabilisierten Toxoplasmen genutzt, um die topologische Verteilung der GPI-Biosyntheseintermediate in der ER-Membran zu untersuchen. Hierbei konnte gezeigt werden, daß sich der überwiegende Teil der Glycolipide auf der cytoplasmatischen Seite des ER befindet.

***T. gondii* wird durch hypotone Behandlung effizient permeabilisiert**

Als ein geeignetes Verfahren, das die gesetzten Voraussetzungen erfüllt, hat sich die hypotone Permeabilisierung erwiesen. Tachyzoiten von *T. gondii* wurden in Verozellen herangezüchtet, nach 48-72 h Kultur aus ihren Wirtszellen freigesetzt und durch Passage über Glaswolle von dem Wirtszellmaterial befreit. Die freien, gereinigten Toxoplasmen wurden in Wasser mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und nach zehnminütigem Quellen in einem Homogenisator nach Dounce mit mehreren Schlägen homogenisiert. Im wesentlichen entspricht dieses Verfahren der Vorbereitung der Parasiten auf eine Markierung mit radioaktiven Nukleotidzuckern im sogenannten zellfreien System (Masterson *et al.*, 1989). Hier mußte jedoch in besonderem Maße darauf geachtet werden, daß die Ausgangskulturen eine ausgesuchte Qualität haben und die Parasiten anschließend schnell und schonend verarbeitet und ständig auf Eis gehalten wurden. Dies ist wichtig, um einen möglichst hohen Anteil unbeschädigter, vitaler Zellen zu Beginn der Permeabilisierung zu haben. So hat zum Beispiel schon das Verfahren der Freisetzung der Parasiten aus den Wirtszellen Einfluß auf ihre Vitalität. Dabei hat sich das Freisetzen mittels Passage durch zunehmend feinere Kanülen (2 x 20 G, 2 x 23 G, 3 x 26 G) als das schonenste Verfahren erwiesen.

Die Poren sind groß genug, um PI-PLC in das Zellinnere gelangen zu lassen

Um nachzuweisen, daß Toxoplasmen durch hypotone Behandlung effektiv permeabilisiert werden, wurde ein stabil mit dem *lacZ*-Gen transfizierter *T. gondii* Stamm verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Frank Seeber, Marburg). Dieser Stamm RH β -1 exprimiert β -Galactosidase als cytoplasmatisches Protein (Seeber und Boothroyd, 1996). Werden diese Zellen permeabilisiert, gelangt die β -Galactosidase in den Überstand und kann dort nach Zentrifugation mit Hilfe einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Sind die Zellen nicht permeabilisiert, verbleibt die β -Galactosidase nach Zentrifugation im Sediment und kann dort nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Stammes RH β -1 hat ergeben, daß *T. gondii*-Zellen effektiv permeabilisiert werden. Da die β -Galactosidase mit einer Größe von ca. 75 kDa ungehindert austreten kann, ist hiermit gleichzeitig nachgewiesen, daß die entstandenen Poren groß genug sind, um PI-PLC (34 kDa) in das Zellinnere gelangen zu lassen. Auch der Zugang der für die Radiomarkierungen eingesetzten tritiierten Nukleotidzucker zum ER ist damit gewährleistet. In Markierungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß in permeabilisierten Zellen die radioaktiven Komponenten effektiv in GPI-Biosyntheseintermediate eingebaut werden. Im Vergleich mit intakten Zellen wurde in permeabilisierten Toxoplasmen eine Steigerung der Markierungseffizienz um das 2,6fache (Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc), 4,2fache (GDP-[³H]Man) bzw. 1,4fache (UDP-[³H]GalNAc) erreicht. Wird eine solche Markierung in Gegenwart von 0,1% Desoxycholat durchgeführt, so findet keine GPI-Biosynthese statt. Bereits die ersten Intermediate der GPI-Synthese GlcNAc-PI und GlcN-PI werden dann nicht mehr gebildet. Der Einbau von UDP-[³H]GlcNAc in Anwesenheit des Detergenz liegt bei 0,7% gegenüber permeabilisierten Zellen ohne Detergenzgabe. Durch das Detergenz wird die Membranstruktur der Zelle nachhaltig gestört und offenbar ist der für die ersten Biosyntheseschritte verantwortliche Enzymkomplex nicht mehr funktionell.

Der Einbau von Nukleotidzuckern in GPI-Biosyntheseintermediate bei Präparationen frischer Toxoplasmen ist auf bereits abgestorbene oder bei der Aufarbeitung geschädigte Parasiten zurückzuführen (ca. 20% einer Präparation sind durch Trypan Blau anfärbbar).

Das ER bleibt durch die hypotone Behandlung unversehrt

Für eine Untersuchung der Verteilung von GPI-Biosyntheseintermediaten über die Doppelmembran des ER ist die Unversehrtheit der ER-Membran von entscheidender Bedeutung. Die Fähigkeit der ER-Membran ein luminales Protein, BiP, vor dem Verdau einer exogen zugegebenen Protease zu schützen, beweist ihre Unversehrtheit. Erst nach Zerstörung des Membrangefüges durch Zugabe eines Detergenz, konnte BiP durch Proteinase K verdaut werden. Unterstützt wird dies durch einen weiteren Versuch: Cerebrosit-Galactosyl-Transferase, ebenfalls ein luminales Protein des ER, ist in

permeabilisierten *T. gondii*-Zellen nicht für Concanavalin A zugänglich und dadurch auch nicht inhibierbar (Dr. Eric Maréchal, Grenoble, Frankreich, persönliche Mitteilung). Auch eine Inkubation der permeabilisierten Parasiten für 2 h bei 37 °C, wie sie für Radiomarkierungs-Experimente durchgeführt wird, und anschließende Behandlung mit PI-PLC haben keinen Einfluß auf die Membranintegrität. Der Einsatz von PI-PLC und anderen Phospholipasen für topologische Studien (Sundler *et al.*, 1978) wurde in der Vergangenheit in Frage gestellt. Vor allem, wenn das Substrat der Enzyme einen wesentlichen Bestandteil der zu untersuchenden Membran darstellt, besteht die Möglichkeit, daß es zur Schädigung (Zerstörung) der Zielmembran kommt (Higgins, 1982; van Meer, 1986; Higgins und Hutson, 1986). Aus mehreren Gründen erscheint es aber unwahrscheinlich, daß PI-PLC die Doppelmembran zerstört und Zugang zu den luminal gelegenen Substraten bekommt, was zu falschen Bestimmungen der transmembralen Verteilung von Glycolipiden führen würde: Erstens werden die PI-PLC-Behandlungen nur für eine kurze Zeit (<30 min) auf Eis durchgeführt, wodurch Änderungen der Membranintegrität minimiert werden. Zweitens ist Phosphatidylinositol nur zu einem relativ geringen Anteil im Spektrum der ER-Phospholipide enthalten (~10%; White, 1973; Higgins *et al.*, 1989), außerdem ist PI-PLC spezifisch für die hydrophile Inositol-Gruppe ("head-group"; Low, 1992), so daß keine massenhafte Spaltung von Lipiden zu erwarten ist. Und schließlich haben eigene Untersuchungen permeabilisierter Zellen nach PI-PLC-Behandlung gezeigt, daß die ER-Membranen nach wie vor in der Lage sind, ein luminales Protein (BiP) vor proteolytischer Spaltung zu schützen (siehe 4.1.8, Abb. 14 B). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, daß PI-PLC membran-impermeabel und somit geeignet ist, die transmembrale Verteilung von GPI-Intermediaten am ER zu untersuchen. Eine Spaltung von GPI-Intermediaten in permeabilisierten Zellen ist demnach ein Zeichen für die cytosolische Orientierung der GPIs, nur diese sind zugänglich für die PI-PLC.

Bisher wurde davon ausgegangen, daß nach hypotoner Behandlung und anschließendem Homogenisieren in einem Homogenisator nach Dounce die Zellstruktur aufgebrochen wird, und man ein sogenanntes "zellfreies System" vorliegen hat. Überraschenderweise hat sich für *T. gondii* herausgestellt, daß dies nicht der Fall ist. Im Phasenkontrastmikroskop bei 400facher Vergrößerung weisen hypoton permeabilisierte Toxoplasmen das gleiche Erscheinungsbild auf wie intakte Zellen, d. h. sie sind weiterhin als einzelne Zellen erkennbar, manche von ihnen sogar in der für Toxoplasmen typischen gebogenen Form. Selbst Verfahren die üblicherweise für Zellfraktionierungen eingesetzt werden, wie wiederholtes Frieren/Tauen und Mixen mit Glasperlen, sind nicht in der Lage die Zellstruktur zu zerstören. Auch hier ist kein Unterschied zu intakten Zellen festzustellen. Verantwortlich für dieses Phänomen ist vermutlich zum einen die geringe Größe der Parasiten (7 µm lang, 2-4 µm breit; Dönges, 1988), wodurch sie den mechanischen Einwirkungen entgehen können, zum

anderen wohl ihre robuste Außenhülle, eine dreischichtige Pellicula, verstärkt durch eine Reihe von Mikrotubuli. Bei meinen Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene ist ebenfalls erkennbar, daß die äußere Zellhülle im wesentlichen erhalten bleibt. Hypoton permeabilisierte Parasiten wurden hierzu fixiert und eingebettet und anschließend im Elektronenmikroskop analysiert (s. Abb. 16). Lediglich der gelöste Zellinhalt scheint auszutreten. Viele Zellorganellen, wie Rhoptrien, Mikronemata, Mitochondrium und Apicoplast, werden in den Zellen zurückgehalten und bleiben erhalten.

Klassische Methoden zur Permeabilisierung von Zellen erfüllen die geforderten Bedingungen nicht

Verschiedene klassische Methoden zur Permeabilisierung von Toxoplasmen führten nicht zum gewünschten Ziel. Einige Gründe hierfür werden vollständigkeithalber im einzelnen beschrieben: Zum einen gibt es die Möglichkeit Detergenzien wie Saponin und Digitonin einzusetzen (Brooks und Treml, 1983; Dunn und Holz, 1983; Wilson und Kirshner, 1983), zum anderen ist der Einsatz von porenbildenden Bakterientoxinen wie α -Toxin (Ahnert-Hilger *et al.*, 1985a,b; Bader *et al.*, 1986), Streptolysin O (Ahnert-Hilger *et al.*, 1985a, 1989a,b; Howell und Gomperts, 1987; Howell *et al.*, 1987), Aerolysin (Buckley *et al.*, 1981; Howard *et al.*, 1987; Abrami *et al.*, 1998; Fivaz *et al.*, 2001) oder Hämolyisin (Schmidt *et al.*, 1996) möglich. Mit Detergenzien werden in den Zielzellen unspezifisch Poren gebildet, die auch nicht stabil sind. Die gebildeten Kanäle sind jedoch groß genug, um auch hochmolekulare Stoffe passieren zu lassen. Sowohl Saponin als auch Digitonin sind in der Lage verschiedene Zelltypen zu permeabilisieren, so daß LDH (135 kDa), Tetanus-Toxin (150 kDa) und Antikörper (IgG: ~150 kDa) austreten bzw. eindringen können (Ahnert-Hilger *et al.*, 1989c und hierin genannte Referenzen). Dadurch besteht aber auch die Gefahr des Eindringens ungebundener Detergenz-Moleküle in das Zellinnere und in der Folge die Schädigung von Zellorganellen. Eigene Untersuchungen an Toxoplasmen haben gezeigt, daß bereits bei einer Konzentration von 0,15% Saponin große Mengen an Proteinen mit einer Molekülgröße von bis zu ~160 kDa freigesetzt werden können, die Zellen aber auch schon nachhaltig zerstört werden. Der Einsatz von Digitonin weist ebenfalls mehrere Nachteile auf: Erstens ist der Einbau von Digitonin in die Zielmembran unabhängig von Inkubationsbedingungen und läßt sich nicht durch unterschiedliche Temperaturen kontrollieren (Ahnert-Hilger *et al.*, 1989b), zweitens werden nicht genügend *T. gondii*-Zellen permeabilisiert (~40-50%) und drittens sind die gebildeten Kanäle nicht über eine längere Zeit stabil (Dr. Sudha Chaturvedi, New Haven, USA, pers. Mitteilung). Im Gegensatz zu den Detergenzien lassen sich mit bakteriellen Exotoxinen gezielt Poren mit definierter Größe in Zielzellen einbringen. Als Beispiel für porenbildende Proteine sei der C5b-9-Komplex der Komplement-Kaskade genannt (Bhakdi und Tranum-Jensen, 1984, 1987).

Aerolysin (Diep *et al.*, 1998; Abrami *et al.*, 1998, 2000) und vor allem α -Toxin (Gordon *et al.*, 1999; Wichroski *et al.*, 2002) nutzen gar GPI-verankerte Proteine als Angriffspunkt – Moleküle also, die bei *T. gondii* in ausreichender Anzahl (GPI-verankertes SAG1 und SAG3; Zinecker *et al.*, 2001, aber auch freie GPIs; Striepen *et al.*, 1997) in der Zelloberfläche vertreten sind. Viele dieser Toxine bilden Poren, die klein genug sind, um das Eindringen ungebundener Monomere zu verhindern. Dadurch bleibt die Porenbildung auf die Plasmamembran beschränkt und es besteht keine Gefahr, daß auch Zellorganellen permeabilisiert werden können. α -Toxin beispielsweise bildet Poren von 1-1,5 nm Durchmesser, durch die keine überschüssigen α -Toxin-Moleküle (34 kDa) eindringen können (Bhakdi *et al.*, 1981; Füssle *et al.*, 1981; Bhakdi und Trantum-Jensen, 1987; Bhakdi *et al.*, 1993). Allerdings sind diese Kanäle damit auch zu klein, um PI-PLC in das Zellinnere gelangen zu lassen – eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der geplanten Untersuchungen. Auch zwei weitere Vertreter dieser Gruppe von Toxinen bilden zu kleine Poren: Hämolyysin (1-2 nm;) und Aerolysin (19-23 Å, entspr. 1,9-2,3 nm; Tschodrich-Rotter *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu können mit Streptolysin O sowohl in verschiedenen kernhaltigen (Howell und Gomperts, 1987; Howell *et al.*, 1987; Gravotta *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1992) als auch in kernlosen Zellen (Bhakdi *et al.*, 1985, Hugo *et al.*, 1986; Bhakdi und Trantum-Jensen, 1987) Poren erzeugt werden, die es erlauben cytosolische Proteine mit einer Größe von >140 kDa freizusetzen. Die Poren können dabei eine Größe von 30 nm im Durchmesser erreichen (Bhakdi *et al.*, 1985). Die Porenbildung mit Streptolysin O (SLO) kann sehr gut über Temperaturveränderungen gesteuert werden. Streptolysin O (69 kDa) inseriert bereits bei niedrigen Temperaturen (0 °C) in die Membran, wobei Cholesterol in der Zielmembran eine Schlüsselrolle spielt (Bhakdi *et al.*, 1985). Die eigentliche Porenbildung, d. h. das Aggregieren der SLO-Monomere, erfolgt erst durch eine Temperaturerhöhung auf 30-37 °C (Ahnert-Hilger *et al.*, 1989b; c). Werden nach Bindung des Streptolysin O in die Zielmembran und vor der Porenbildung überschüssige Monomere entfernt, besteht daher nicht die Gefahr Zellorganelle zu permeabilisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es jedoch nicht, *T. gondii* mit Streptolysin O in der gewünschten Weise zu permeabilisieren. Bei Streptolysin O-behandelten Parasiten (Bhakdi *et al.*, 1985; SLO freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Bhakdi, Mainz) können lediglich 10% der Proteine in den Überstand freigesetzt werden, der Rest verbleibt nach Zentrifugation im Sediment. Auch eine Erhöhung der Streptolysin O-Konzentration bringt keine Verbesserung der Permeabilisierung. Da teilweise die Quelle des Streptolysin O eine Rolle spielt (Ahnert-Hilger *et al.*, 1989c), wurde eine kommerziell erhältliche SLO-Präparation getestet (Murex Diagnostic, Dartford, UK). Mit 1 U/ml Streptolysin O aus dieser Quelle lassen sich ca. 45% der *T. gondii*-Zellen permeabilisieren. Der Einbau von radioaktiven Nukleotidzuckern in GPI-

Biosyntheseintermediate lässt sich durch SLO-Behandlung jedoch nicht wesentlich verbessern. Bei der Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc wird eine Steigerung der Markierungseffizienz von 17%, bei der Markierung mit GDP-[³H]Man von 32% erzielt (bezogen jeweils auf parallele Inkubationen mit intakten Parasiten). Bei der Markierung mit UDP-[³H]GalNAc ergibt sich sogar ein Rückgang um 20%. Die Steigerung der Markierungseffizienz bei UDP-[³H]GlcNAc und GDP-[³H]Man liegt damit in dem Bereich der erhöhten Anfärbbarkeit SLO-permeabilisierter Zellen (45% SLO gegenüber 20% intakter Zellen). Im Gegensatz dazu kann durch hypotone Permeabilisierung eine sehr deutliche Erhöhung der Markierungseffizienz erzielt werden (2,6fach bei Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc, 4,2fach mit GDP-[³H]Man und 1,4fach mit UDP-[³H]GalNAc; s. o.). Außerdem können in Streptolysin O-permeabilisierten Toxoplasmen keine radioaktiv markierten Glycolipide mit PI-PLC gespalten werden. Erst nach Zerstörung der Membranstruktur durch Zugabe von 0,1% Desoxychololat läßt sich ein signifikanter Anteil der Glycolipide (68%) spalten. Dies kann zwei Ursachen haben: Die Glycolipide sind auf der luminalen Seite des ER vor der Spaltung durch das Enzym geschützt oder die Parasiten sind nicht ausreichend permeabilisiert, d. h. PI-PLC gelangt nicht durch die Zellmembran an die cytoplasmatische Seite des ER. Wie sich in späteren Versuchen mit hypoton permeabilisierten Toxoplasmen jedoch gezeigt hat, ist ein Großteil der GPI-Intermediate sehr wohl für PI-PLC zugänglich (s. u.). Zusammengefasst folgt aus diesen Daten, daß auch mit Streptolysin O aus kommerzieller Herkunft *T. gondii*-Zellen nicht effektiv permeabilisiert werden können, um die gewünschten Untersuchungen durchführen zu können. Dies bedeutet jedoch nicht, daß der Einsatz von Streptolysin O zur Permeabilisierung von *T. gondii* grundsätzlich auszuschließen ist, sondern daß er abhängig von der jeweiligen Fragestellung ist. So konnten in einer anderen Arbeitsgruppe Streptolysin O-permeabilisierte Toxoplasmen genutzt werden, um die Calcium-unabhängige Freisetzung der dichten Granula zu zeigen (Chaturvedi *et al.*, 1999).

***in vivo*- und *in vitro*-synthetisierte GPIs von *T. gondii* haben identische hydrophile Anteile, unterscheiden sich aber im hydrophoben Anteil**

Im Verlauf der Voruntersuchungen zur Permeabilisierung von *T. gondii* wurden Laufunterschiede auf der DC zwischen *in vivo* mit [³H]GlcN und *in vitro* markierten Glycolipiden (z. B. bei Markierung mit GDP-[³H]Man) offenbar. Bei der bis Ende der 90er Jahre ausschließlich eingesetzten eindimensionalen Analysetechnik mit dem Berthold DC-Platten-Scanner (Berthold LB 2842, Wildbad) wurden diese Laufunterschiede nicht erkannt oder anderen Phänomenen zugeordnet. Dieses Gerät besitzt zwar eine hohe Empfindlichkeit (typische Scandauer: 30-120 min), zeigt dabei aber eine geringe Auflösung. Auf der Dünnschichtplatte benachbarte Glycolipide erscheinen, bedingt durch die Meßmethode, sehr breit und sind oft nicht voneinander getrennt. Erst durch den routinemäßigen Einsatz der zweidimensionalen Analyse mit einem Bio-Imager (Raytest, Straubenhardt) können benachbarte Glycolipide klar voneinander getrennt dargestellt werden. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist gering (typische Expositionsdauer: 3-6 Wochen), die Auflösung dagegen sehr gut. Auf dem zweidimensionalen Abbild der Dünnschichtplatte können außerdem Abweichungen im Verlauf der Laufmittelfront deutlich erkannt werden.

Da für die weiteren geplanten Versuche eine sichere Identifizierung der einzelnen Glycolipide unabdingbar war, wurden ausführliche Untersuchungen zur Charakterisierung der von permeabilisierten Toxoplasmen gebildeten Glycolipide vorgenommen und mit den bekannten Daten verglichen. Es hat sich herausgestellt, daß die Laufunterschiede zwischen *in vivo* mit [³H]GlcN und *in vitro* markierten Glycolipiden auf Unterschiede der hydrophoben Fettsäurekomponenten zurückzuführen sind. Im Gegensatz dazu wurden durch Darstellung der hydrophilen Zuckereinheiten und Core-Glycane der von permeabilisierten Toxoplasmen gebildeten GPIs die bisher beschriebenen Strukturen (Striepen *et al.*, 1997; Zieneker *et al.*, 2001) bestätigt. Die für die geplanten Untersuchungen entscheidenden Komponenten, d. h. die hydrophilen Anteile der GPIs, entsprechen also den *in vivo* gebildeten Glycolipiden.

***T. gondii* bildet acylierte GPI-Intermediate**

Bei *P. falciparum* wird in Analogie zur GPI-Biosynthese in Säugetierzellen und Hefe (Urakaze *et al.*, 1992; Costello und Orlean, 1992; Englund, 1993) eine Fettsäure an das Inositol geknüpft, bevor die Mannosen auf das deacetylierte Glucosamin übertragen werden (Gerold *et al.*, 1994; 1999). Bei *T. brucei* finden dagegen Acylierung und Deacylierung des Inositols parallel zu den Mannosylierungsschritten, frühestens aber nach Übertragung der ersten Mannose statt (Güther *et al.*, 1994; Güther und Ferguson, 1995; Smith *et al.*, 1999). Solch eine hydrophobe Modifikation verhindert bei GPIs die Spaltung durch das Enzym PI-PLC. Auch für *T. gondii* wurden solche PI-PLC-resistente Zwischenprodukte bereits früher beschrieben (Tomavo *et al.*, 1992b, c;

Striepen *et al.*, 1997), eine eindeutige Charakterisierung war bisher jedoch nicht erfolgt. Bei der Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc konnte jetzt auch für *T. gondii* ein acyliertes, transientes Intermediat eindeutig identifiziert und charakterisiert werden. Werden dem Reaktionsansatz zur Markierung permeabilisierter Toxoplasmen zweiwertige Kationen, vor allem Mn²⁺ und Mg²⁺, entzogen, so akkumulieren drei Intermediate. Dies sind die erwarteten Produkte GlcNAc-PI und GlcN-PI und ein zusätzliches Produkt. Durch enzymatische und chemische Behandlungen konnte nachgewiesen werden, daß es sich dabei um GlcN-(acyl)-PI handelt. In Zusammenarbeit mit Dr. Terry Smith (Dundee, Schottland) konnte gezeigt werden, daß die Acylierung von GlcN-PI durch PMSF inhibierbar ist (nicht publizierte Daten), nicht aber durch DFP wie bei *T. brucei* (Güther *et al.*, 1994). Dagegen ist die Deacylierung von Man₃-GlcN-(acyl)-PI zu Man₃-GlcN-PI sowohl durch PMSF als auch durch DFP hemmbar (Smith *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Diese Daten zeigen, daß der Biosyntheseweg dem Modell von *P. falciparum* folgt (Gerold *et al.*, 1994) und die Acylierung bei *T. gondii* ebenfalls vor der Übertragung des ersten Mannoserestes erfolgt. Auch bei der radioaktiven Markierung mit GDP-[³H]Man sind in den Extrakten PI-PLC-resistente Glycolipide zu finden. Abgesehen von Dol-P-Man, das mit der Laufmittelfront migriert, handelt es sich dabei ausschließlich um GPI-Intermediate. Die eindeutige Zuordnung und Charakterisierung ist hier jedoch außerordentlich schwierig, da die acylierten mit nicht-acylierten Intermediaten in der Dünnschichtchromatographie größtenteils komigrieren. Eine Unterscheidung ist nur durch das unterschiedliche Spaltungsverhalten gegenüber PI-PLC möglich. Zusätzlich sind von bestimmten Glycolipiden auch lyso-Formen beschrieben (Striepen *et al.*, 1997).

Die Unterschiede im hydrophoben Anteil zwischen *in vivo* und *in vitro* gebildeten GPIs, die (transiente) Acylierung von Intermediaten und das Auftreten von lyso-Formen deuten darauf hin, daß bei *T. gondii* ein nachträglicher Austausch von Fettsäuren im Phosphatidyl-Anteil stattfindet. Ein sogenanntes "fatty acid remodelling" wurde bereits für *T. brucei* beschrieben (Masterson *et al.*, 1990; Buxbaum, 1994; Buxbaum *et al.*, 1994; Güther und Ferguson, 1995) und wird in der AG Parasitologie, Philipps-Universität Marburg, weiter untersucht.

Die GPI-Biosynthese beginnt auf der cytoplasmatischen Seite des ER

Die GPI-Biosynthese ist ein aus vielen Einzelschritten bestehender Prozeß, der zahlreiche verschiedene Enzyme erfordert. So werden mindestens vier Glycosyltransferasen, eine Deacetylase und eine Ethanolamintransferase benötigt (für eine Übersicht siehe Kinoshita *et al.*, 1997; Kinoshita und Inoue, 2000; Ferguson, 1999; Ikezawa, 2002). Die Übertragung vorgefertigter GPI-Anker auf neu synthetisierte Proteine erfolgt zügig (1-5 min) unter Abspaltung einer carboxy-terminalen GPI-Signalsequenz (zusammengefaßt in Ferguson und Williams, 1988; Ikezawa, 2002). Diese und eine Reihe weiterer Daten (Conzelmann *et al.*, 1988; Kodukula *et al.*, 1992; Vidugiriene und Menon, 1993; 1994) deuteten schon früh darauf hin, daß diese Vorgänge im ER erfolgen. Die Arbeiten von Vidugiriene und Menon waren dabei die ersten, die gezielt die Orientierung der GPI-Biosyntheseintermediate in der ER-Membran untersuchten. An ER-Mikrosomen und Streptolysin O-permeabilisierten Zellen einer Thy-1⁺ Mauszelllinie (BW5147.3) wurden zunächst die frühen GPI-Biosyntheseintermediate GlcNAc-PI und GlcN-PI untersucht. Durch die Behandlung radioaktiv markierter ER-Mikrosomen mit PI-PLC konnten ca. 70% von GlcNAc-PI und GlcN-PI gespalten werden, was bedeutet, daß der überwiegende Anteil dieser Glycolipide auf der äußeren (cytoplasmatischen) Seite der Mikrosomen orientiert ist (Vidugiriene und Menon, 1993). Ähnliche Ergebnisse wurden an Streptolysin O-permeabilisierten Zellen der gleichen Zelllinie erzielt. Hier konnten nach Permeabilisierung und radioaktiver Markierung mit UDP-[³H]GlcNAc ca. 85% der beiden Glycolipide durch PI-PLC-Behandlung gespalten werden (Vidugiriene und Menon, 1993). Weiterführende Untersuchungen an Mikrosomen von *T. brucei* haben diese Ergebnisse auch für höher glycosylierte GPI-Intermediate bestätigt. Sowohl die mannosylierten Intermediate Man₁-GlcN-PI und Man₂-GlcN-PI als auch der ethanolamin-haltige GPI-Ankervorläufer P2 (EtN-P-Man₂-GlcN-PI) wurden zu mehr als 60% auf der äußeren, also cytoplasmatischen Seite der Mikrosomenmembran nachgewiesen (Vidugiriene und Menon, 1994). Mit der vorliegenden Arbeit konnten nun diese Ergebnisse bei einem anderen wichtigen humanpathogenen Parasiten nicht nur bestätigt werden, vielmehr konnte auch erstmals die Orientierung von GPI-Biosyntheseintermediaten und GPI-Ankervorläufern dargestellt werden, die durch Seitengruppen am Core-Glycan modifiziert sind. Das oben beschriebene System durch hypotone Behandlung permeabilisierter Tachyzoiten von *T. gondii* wurde eingesetzt, um Untersuchungen zur Verteilung von GPI-Biosyntheseintermediaten in der ER-Membran durchzuführen. Zunächst konnten Ergebnisse zur Orientierung der frühen GPI-Biosyntheseintermediate bestätigt werden: Von GlcNAc-PI, dem ersten Produkt der GPI-Biosynthese, zeigen $70,7 \pm 6,2\%$ eine cytosolische Orientierung, von dem Folgeprodukt GlcN-PI $82,2 \pm 6,2\%$. Die für den ersten Schritt verantwortliche GPI-N-Acetylglucosaminyltransferase (GPI-GnT) besteht in Säugerzellen aus mindestens sechs

Proteinen, bei *S. cerevisiae* sind bisher fünf Genprodukte beschrieben (zusammengefaßt in Kinoshita und Inoue, 2000). Für die (GlcNAc-PI) de-*N*-Acetylase ist jeweils ein Genprodukt bekannt, das PIG-L (Säugerzellen) bzw. GPI12 (*S. cerevisiae*; Watanabe *et al.*, 1999). Für beide Reaktionen deuten die Ergebnisse darauf hin, daß die katalytischen Domänen (PIG-A bei GPI-GnT) auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran liegen (Ferguson, 1999; Kinoshita und Inoue, 2000), wodurch eigene Untersuchungen an *T. gondii* und frühere Untersuchungen von Vidugiriene und Menon (1993; 1994) bestätigt werden. Bei *T. gondii* erfolgt als nächster Schritt nun die Acylierung an der C2-Position des *myo*-Inositols (eigene Untersuchungen) - analog zu den Reaktionen bei Säugerzellen, *S. cerevisiae* und *P. falciparum* (Gerold *et al.*, 1994; 1999; Kinoshita und Inoue, 2000; Ikezawa, 2002). Aufgrund der Acylierung ist dieses Intermediat jedoch insensitive gegenüber der PI-PLC-Behandlung (Roberts *et al.*, 1988), weshalb keine Aussage über die Verteilung in der ER-Membran getroffen werden kann. In Säugerzellen konnte jedoch kürzlich ein Gen (PIG-W) identifiziert werden, welches höchstwahrscheinlich für die Inositol-Acyltransferase codiert (Murakami *et al.*, 2003). Untersuchungen an dem Enzym deuten darauf hin, daß die katalytische Einheit auf der luminalen Seite des ER liegt.

Interessant werden die Untersuchungen ab dem nächsten Schritt, der Übertragung der ersten Mannose auf GlcN-PI zur Bildung von Man₁-GlcN-PI. In der GPI α 1-4-Mannosyltransferase (GPI-MT)-I wurde bei Säugerzellen ein für Glycosyltransferasen typisches DXD-Motiv innerhalb einer ER-luminalen Domäne beschrieben (Maeda *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, daß die Übertragung der Mannose auf der luminalen Seite des ER stattfindet. Auch für die folgenden Biosyntheseschritte werden luminaire Transferasen vermutet (Kinoshita und Inoue, 2000), eindeutige Ergebnisse liegen hierzu jedoch noch nicht vor. Die bereits oben geschilderten Ergebnisse von Vidugiriene und Menon (1994) mit einer überwiegenden Präsenz der mannosylierten Intermediate auf der cytoplasmatischen Seite des ER scheinen dagegen zu sprechen. Diese Verteilung sagt aber nicht unbedingt etwas darüber aus, auf welcher Seite der ER-Membran die Biosynthese-Schritte erfolgen. Auch eigene Untersuchungen an *T. gondii* haben eine solche Verteilung der Glycolipide gezeigt (siehe zusammengefaßte Ergebnisse in Tab. 2). So wurde für Man₁-GlcN-PI zwar nur ein Anteil von $39,4 \pm 5,0\%$ auf der cytoplasmatischen Seite ermittelt, dies liegt aber daran, daß das Material auf der Dünnschichtplatte von einem acylierten Intermediat (Man₃-GlcN-(acyl)-PI) überlagert wird. Deutlich wird dies, wenn man die Spaltungseffizienz nach Zerstörung der ER-Membran durch ein Detergenz betrachtet: Auch unter diesen Bedingungen sind nur $52,7 \pm 8,2\%$ des Materials spaltbar. Die Erhöhung der Spaltungseffizienz nach Detergenz-Einsatz um $13,4\%$ ist jedoch signifikant ($p=0,03$).

Auch höher glycosylierte und modifizierte GPI-Intermediate befinden sich überwiegend auf der cytosolischen Seite des ER

Erstmals gelang es im Rahmen dieser Doktorarbeit die Verteilung von GPI-Intermediaten und GPI-Anker-Vorläufermolekülen zu bestimmen, die am Mannose-Grundgerüst durch eine GalNAc- oder GalNAc-Glc-Seitenkette modifiziert sind. So wurden für *T. gondii*-Glycolipide I-VI PI-PLC-sensitive Anteile zwischen $59,2 \pm 1,9\%$ (Glycolipid VI) und $74,5 \pm 2,0\%$ (Glycolipid I) bestimmt. Das heißt, daß auch diese fortgeschrittenen Intermediate und direkten Donoren für zu verankernde Proteine zu einem überwiegenden Anteil eine cytoplasmatische Orientierung aufweisen. Dies scheint im Widerspruch zu der Übertragung der GPI-Ankervorläufer (Glycolipide II und III) auf naszente Proteine zu stehen, die im Lumen des ER stattfindet. Dazu müssen die GPI-Intermediate spätestens nach Übertragung des Ethanolaminphosphates über die ER-Membran transferiert werden. Im Falle der *T. gondii*-Glycolipide II (EtN-Man₃-(GalNAc-Glc)-GlcN-PI) und III (EtN-Man₃-(GalNAc)-GlcN-PI) handelt es sich um Moleküle mit großen hydrophilen Einheiten, die eine Lipid-Doppelmembran überqueren müssen. Dieser Vorgang ist der N-Glycan-Biosynthese sehr ähnlich: Auch hier wird ein Oligosaccharid, bestehend aus fünf Mannosen und zwei GlcNAc-Molekülen, gebildet, welches an einen lipophilen Träger (Dolicholpyrophosphat) gekoppelt ist und dann die ER-Membran für den weiteren Biosyntheseweg überqueren muß (Helenius und Aebi, 2002; Helenius *et al.*, 2002). Die hydrophobe Barriere in Form der Lipid-Doppelmembran bedeutet auch eine große Energiebarriere. Diese zu überwinden bedarf es besonderer Transporter. Für diesen Vorgang werden sogenannte Flippasen postuliert, die den Transport der cytosolisch (vor-)gefertigten Glycolipide ins Innere des ER gewährleisten (Menon und Vidugiriene, 1994; Menon, 1995; Vidugiriene *et al.*, 1999). Bisher konnte noch keine solche Flippase gereinigt und charakterisiert werden. Jedoch ist es mittlerweile gelungen, in rekonstituierten Proteoliposomen aus Ratten-ER eine um das 15-fach erhöhte Flippase-Aktivität nachzuweisen (Gummadi und Menon, 2002). Wie bereits oben für das Säugerzellen-System beschrieben, erfolgt der Transfer zur weiteren GPI-Biosynthese in das ER-Lumen aber möglicherweise bereits für den ersten Mannosylierungs-Schritt. Warum sind also höher glycosylierte Intermediate und sogar GPI-Ankervorläufer trotzdem zum Großteil auf der cytosolischen Seite des ER zu finden? Über die Beantwortung dieser Frage kann bisher nur spekuliert werden. Es liegt die Vermutung nahe, daß die GPI-Intermediate von *T. gondii* zu scheinbar jedem Zeitpunkt die ER-Doppelmembran mit Hilfe von Flippasen passieren können. Möglicherweise stehen diese Vorgänge im Zusammenhang mit transienten Acylierungen der Intermediate, wie sie auch für *T. brucei* beschrieben wurden (Güther und Ferguson, 1995; Güther *et al.*, 2003). In Säugerzellen wird das Inositol bereits vor der Übertragung der ersten Mannose acyliert und diese Acylierung erst nach Verknüpfen des GPIs mit dem Protein wieder entfernt. Im Gegensatz dazu

wird bei *T. brucei* erst nach der Übertragung der ersten Mannose acyliert. Diese Acylierung kann dann im weiteren Verlauf der Mannosylierung wechselweise wieder entfernt und hinzugefügt werden. Es ist denkbar, daß die Acylierung und Deacylierung dabei regulative Funktionen zur Steuerung der GPI-Biosynthese erfüllt. Auf der cytoplasmatischen Seite vorhandene Intermediate könnten dabei einen Speicherort für diese Produkte darstellen. GPI-Intermediate näher an die ER-Membran - und damit näher an das aktive Zentrum von Glycosyltransferasen - zu bringen, könnte ein anderer Grund für eine transiente Acylierung sein.

Ein Teil des GPI-Materials ist vor der Spaltung durch PI-PLC geschützt

Wie bereits beschrieben findet sich der überwiegende Anteil der *T. gondii* GPI-Intermediate auf der cytoplasmatischen Seite der ER-Membran. Ein signifikanter Anteil dieser Produkte kann aber erst durch Zugabe eines Detergenz und damit der Zerstörung der ER-Membran mittels PI-PLC gespalten werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben: Für GlcNAc-PI und GlcN-PI scheint klar, daß diese auf der cytosolischen Seite des ER gebildet werden. Hier scheint die Ursache für eine inkomplette Spaltung darin zu liegen, daß diese Intermediate in noch unbekannter Weise durch nicht-kovalente Interaktionen mit anderen Lipiden oder Proteinen vor dem PI-PLC Verdau geschützt sind. Dieses Phänomen wurde bereits vor längerer Zeit für GPI-verankerte Membranproteine beschrieben (Low und Kincade, 1985). Durch den Einsatz des Detergenz werden sterische Behinderungen durch andere Moleküle minimiert und die Spaltungseffizienz der GPI-Substrate erhöht. Es ist aber auch nicht ganz auszuschließen, daß ein Teil des GlcNAc-PI- und GlcN-PI-Materials in der luminalen Seite der ER-Membran vorhanden ist. Etwas anders sieht dies bei den höher glycosylierten Intermediaten und GPI-Ankervorläufern aus. Hier muß davon ausgegangen werden, daß spätestens die direkten Ankermoleküle zu einem gewissen Anteil im ER-Lumen vorhanden sind. Dies scheint auch durch die durchgeführten Spaltungsexperimente bestätigt zu sein: Zwar befindet sich auch hier der überwiegende Teil auf der cytoplasmatischen Seite, aber durch den Einsatz von Detergenz zur Zerstörung der Membranstrukturen kann ein signifikant deutlicher Teil (im Durchschnitt 21%) zusätzlich gespalten werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß sich ein Teil des Materials tatsächlich auf der luminalen Seite des ER befindet und daher vor dem PI-PLC Verdau geschützt ist.

Ausblick

Mit den vorgestellten Arbeiten konnten neue und teilweise überraschende Erkenntnisse zur Verteilung von GPI-Biosyntheseintermediaten über die ER-Membranen bei *T. gondii* gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, daß am GPI-Grundgerüst modifizierte Intermediate und selbst GPI-Ankervorläufer zum

überwiegenden Teil auf der cytoplasmatischen Seite des ER zu finden sind. Die Beantwortung der Frage nach dem subzellulären Ort der Übertragung von Einzelkomponenten zur GPI-Biosynthese bedarf allerdings noch weitergehender Untersuchungen. Einen Anhaltspunkt könnte dabei die Identifizierung des Donors für die GalNAc-Modifikation liefern. Sehr hilfreich wäre es, fände man einen Donor, der nur auf einer Seite der ER-Membran präsent ist. Frühere Hinweise, daß nicht UDP-GalNAc der direkte Donor für diese Modifikation, sondern ein lipophiler Überträger zwischengeschaltet ist (Tomavo *et al.*, 1992c, Hyams, 1998), minimieren allerdings diese Hoffnung. Wichtig wird es daher sein, einzelne Enzyme des Biosynthese-Apparates bei *T. gondii* zu identifizieren und charakterisieren. So konnte in der AG Parasitologie mittlerweile das GPI8-Gen bei *T. gondii* identifiziert werden (Genbank-Nr. CAD44992). Das Genprodukt, die katalytische Komponente der Transamidase, wird zur Zeit exprimiert. Ein weiteres Gen, das für die Inositol-Acylase codiert (PIG-W), ist ebenfalls teilweise identifiziert. Mit Hilfe daraus resultierender Erkenntnisse wird es dann auch möglich sein, Unterschiede zu dem Biosyntheseweg in Säugerzellen zu erkennen, um auf dieser Grundlage Chemotherapeutika gegen die Parasiten entwickeln zu können. Das hier entwickelte System permeabilisierter Toxoplasmen kann zusätzlich genutzt werden, um weitergehende Untersuchungen in diese Richtung auf biochemischem Weg durchzuführen.

6 Abkürzungsverzeichnis

BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
C/M	Chloroform/Methanol
C/M/W	Chloroform/Methanol/Wasser
CPRG	Chlorophenol Rot- β -D-Galactopyranosid
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
Dol-PMan	Dolicholphosphat-Mannose
DU	Dionex-Einheiten (Dionex unit)
EtN	Ethanolamin
EtN-P	Ethanolamin-Phosphat
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-Galactosamin
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-Glucosamin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPI-PLD	Glycosylphosphatidylinositol-spezifische Phospholipase D
GU	Glucose-Einheiten (glucose unit)
HPAEC	high pH anion exchange chromatography
LSC	Flüssigkeitsszintillations-Zähler
Man	Mannose
MSP	Hauptoberflächenprotein von Plasmodien (major surface protein)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
PBS	phosphate buffered saline
PBS ⁺⁺	PBS mit Mg ²⁺ und Ca ²⁺
PE	Parasitenequivalente
PI	Phosphatidylinositol
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSL	photostimulated luminiscence
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SAG	Oberflächenantigen von <i>T. gondii</i> (surface antigen)
SLO	Streptolysin O
SSC	sodium saline citrate
TLCK	Na-Tosyl-L-lysinchloromethylketon-Hydrochlorid
VSG	variables Oberflächen-Glycoprotein von <i>T. brucei</i> (variant surface glycoprotein)

7 Literatur

- Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P.E., Parton, R.G. und van der Goot, F.G. (1998) A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **140**, 525-40.
- Abrami, L., Fivaz, M. und van der Goot, F.G. (2000) Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol*, **8**, 168-72.
- Adair, O.V., Randive, N. und Krasnow, N. (1989) Isolated toxoplasma myocarditis in acquired immune deficiency syndrome. *Am Heart J*, **118**, 856-7.
- Ahnert-Hilger, G., Bhakdi, S. und Gratzl, M. (1985a) Alpha-toxin permeabilized rat pheochromocytoma cells: a new approach to investigate stimulus-secretion coupling. *Neurosci Lett*, **58**, 107-10.
- Ahnert-Hilger, G., Bhakdi, S. und Gratzl, M. (1985b) Minimal requirements for exocytosis. A study using PC 12 cells permeabilized with staphylococcal alpha-toxin. *J Biol Chem*, **260**, 12730-4.
- Ahnert-Hilger, G., Bader, M.F., Bhakdi, S. und Gratzl, M. (1989a) Introduction of macromolecules into bovine adrenal medullary chromaffin cells and rat pheochromocytoma cells (PC12) by permeabilization with streptolysin O: inhibitory effect of tetanus toxin on catecholamine secretion. *J Neurochem*, **52**, 1751-8.
- Ahnert-Hilger, G., Mach, W., Fohr, K.J. und Gratzl, M. (1989b) Poration by alpha-toxin and streptolysin O: an approach to analyze intracellular processes. *Methods Cell Biol*, **31**, 63-90.
- Ahnert-Hilger, G., Weller, U., Dauzenroth, M.E., Habermann, E. und Gratzl, M. (1989c) The tetanus toxin light chain inhibits exocytosis. *FEBS Lett*, **242**, 245-8.
- Almeida, I.C., Camargo, M.M., Procopio, D.O., Silva, L.S., Mehlert, A., Travassos, L.R., Gazzinelli, R.T. und Ferguson, M.A. (2000) Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *Embo J*, **19**, 1476-85.
- Bader, M.F., Thierse, D., Aunis, D., Ahnert-Hilger, G. und Gratzl, M. (1986) Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J Biol Chem*, **261**, 5777-83.
- Bhakdi, S., Füssle, R. und Trantum-Jensen, J. (1981) Staphylococcal alpha-toxin: oligomerization of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycholate detergent micelles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 5475-9.
- Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J. und Sziegoleit, A. (1985) Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun*, **47**, 52-60.

- Bhakdi, S. und Trantum-Jensen, J. (1987) Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **107**, 147-223.
- Bhakdi, S., Weller, U., Walev, I., Martin, E., Jonas, D. und Palmer, M. (1993) A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **182**, 167-75.
- Brooks, J.C. und Treml, S. (1983) Catecholamine secretion by chemically skinned cultured chromaffin cells. *J Neurochem*, **40**, 468-73.
- Buckley, J.T., Halasa, L.N., Lund, K.D. und MacIntyre, S. (1981) Purification and some properties of the hemolytic toxin aerolysin. *Can J Biochem*, **59**, 430-5.
- Buxbaum, L.U. (1994) Myristate exchange in glycolipid A and VSG of African trypanosomes. *Braz J Med Biol Res*, **27**, 115-9.
- Buxbaum, L.U., Raper, J., Opperdoes, F.R. und Englund, P.T. (1994) Myristate exchange. A second glycosyl phosphatidylinositol myristoylation reaction in African trypanosomes. *J Biol Chem*, **269**, 30212-20.
- Caras, I.W. und Weddell, G.N. (1989) Signal peptide for protein secretion directing glycopospholipid membrane anchor attachment. *Science*, **243**, 1196-8.
- Cardoso de Almeida, M.L. und Turner, M.J. (1983) The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, **302**, 349-52.
- Carruthers, V.B. (2002) Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*, **81**, 111-22.
- Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P.I., Striepen, B., Roos, D.S. und Joiner, K.A. (1999) Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J Biol Chem*, **274**, 2424-31.
- Clayton, C., Hausler, T. und Blattner, J. (1995) Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Rev*, **59**, 325-44.
- Conzelmann, A., Riezman, H., Desponds, C. und Bron, C. (1988) A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *Embo J*, **7**, 2233-40.
- Costello, L.C. und Orlean, P. (1992) Inositol acylation of a potential glycosyl phosphoinositol anchor precursor from yeast requires acyl coenzyme A. *J Biol Chem*, **267**, 8599-603.
- Cross, G.A. (1996) Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly. *Bioessays*, **18**, 283-91.
- Davitz, M.A., Hom, J. und Schenkman, S. (1989) Purification of a glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase D from human plasma. *J Biol Chem*, **264**, 13760-4.

- de Melo, E.J. und de Souza, W. (1997) A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*, **83**, 252-6.
- Debierre-Grockiego, F., Azzouz, N., Schmidt, J., Dubremetz, J.F., Geyer, H., Geyer, R., Weingart, R., Schmidt, R.R. und Schwarz, R.T. (2003) Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor- α production in macrophages. *J Biol Chem*, **278**, 32987-93.
- Desmonts, G. und Couvreur, J. (1974) Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med*, **50**, 146-59.
- Diep, D.B., Nelson, K.L., Raja, S.M., Pleshak, E.N. und Buckley, J.T. (1998) Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem*, **273**, 2355-60.
- Doering, T.L., Masterson, W.J., Englund, P.T. und Hart, G.W. (1989) Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. *J Biol Chem*, **264**, 11168-73.
- Dönges, J. (1988) *Parasitologie: Mit besonderer Berücksichtigung humanpathogener Formen*. Thieme, Stuttgart; New York.
- Dubremetz, J.F. und Torpier, G. (1978) Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *J Ultrastruct Res*, **62**, 94-109.
- Dubremetz, J.F. (1998) Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol*, **6**, 27-30.
- Dunn, L.A. und Holz, R.W. (1983) Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *J Biol Chem*, **258**, 4989-93.
- Eckert, V., Gerold, P. und Schwarz, R.T. (1996) GPI anchor: structure and function. In Gabius, H.J. und Gabius, S. (eds.), *Glycosciences: Status and Perspectives*. Chapman & Hall, Weinheim, pp. 223-243.
- Englund, P.T. (1993) The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem*, **62**, 121-38.
- Ferguson, M.A. und Cross, G.A. (1984) Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Biol Chem*, **259**, 3011-5.
- Ferguson, M.A., Haldar, K. und Cross, G.A. (1985) *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein has a sn-1,2-dimyristyl glycerol membrane anchor at its COOH terminus. *J Biol Chem*, **260**, 4963-8.
- Ferguson, M.A., Homans, S.W., Dwek, R.A. und Rademacher, T.W. (1988) Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, **239**, 753-9.

- Ferguson, M.A. und Williams, A.F. (1988) Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem*, **57**, 285-320.
- Ferguson, M.A.J. (1993) GPI membrane anchors: isolation and analysis. In Fukuda, M. und Kobata, A. (eds.), *Glycobiology*. Oxford University Press, Oxford, Vol. 125, pp. 349-383.
- Ferguson, M.A., Brimacombe, J.S., Cottaz, S., Field, R.A., Güther, L.S., Homans, S.W., McConville, M.J., Mehlert, A., Milne, K.G., Ralton, J.E. und et al. (1994) Glycosyl-phosphatidylinositol molecules of the parasite and the host. *Parasitology*, **108**, S45-54.
- Ferguson, M.A. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosyl-phosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*, **112**, 2799-809.
- Ferguson, M.A. (2000) Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10673-5.
- Field, M.C. und Menon, A.K. (1992) Biosynthesis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. In Hooper, N.M. und Turner, A.J. (eds.), *Lipid modification of proteins*. Oxford University Press, Oxford, pp. 155-190.
- Field, M.C. und Menon, A.K. (1993) Glycolipid anchoring of cell surface proteins. In Schlesinger, M.J. (ed.) *Lipid Modifications of Proteins*. CRS Press, Boca Raton, pp. 84-114.
- Fivaz, M., Abrami, L., Tsitritin, Y. und van der Goot, F.G. (2001) Not as simple as just punching a hole. *Toxicon*, **39**, 1637-45.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P. und Miller, N.L. (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, **167**, 893-6.
- Füssle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Trantum-Jensen, J., Kranz, T. und Wellensiek, H.J. (1981) On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *J Cell Biol*, **91**, 83-94.
- Gaulton, G.N. und Pratt, J.C. (1994) Glycosylated phosphatidylinositol molecules as second messengers. *Semin Immunol*, **6**, 97-104.
- Gerold, P., Dieckmann-Schuppert, A. und Schwarz, R.T. (1994) Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J Biol Chem*, **269**, 2597-606.
- Gerold, P., Schofield, L., Blackman, M.J., Holder, A.A. und Schwarz, R.T. (1996a) Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **75**, 131-43.

- Gerold, P., Striepen, B., Reitter, B., Geyer, H., Geyer, R., Reinwald, E., Risse, H.J. und Schwarz, R.T. (1996b) Glycosyl-phosphatidylinositols of *Trypanosoma congolense*: two common precursors but a new protein-anchor. *J Mol Biol*, **261**, 181-94.
- Gerold, P., Jung, N., Azzouz, N., Freiberg, N., Kobe, S. und Schwarz, R.T. (1999) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* in a cell-free incubation system: inositol acylation is needed for mannosylation of glycosylphosphatidylinositols. *Biochem J*, **344**, 731-8.
- Gerold, P. und Schwarz, R.T. (2002) Metabolic labeling and structural analysis of glycosylphosphatidylinositols from parasitic protozoa. *Methods Mol Biol*, **194**, 143-58.
- Gordon, V.M., Nelson, K.L., Buckley, J.T., Stevens, V.L., Tweten, R.K., Elwood, P.C. und Leppla, S.H. (1999) *Clostridium septicum* alpha toxin uses glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein receptors. *J Biol Chem*, **274**, 27274-80.
- Gravotta, D., Adesnik, M. und Sabatini, D.D. (1990) Transport of influenza HA from the trans-Golgi network to the apical surface of MDCK cells permeabilized in their basolateral plasma membranes: energy dependence and involvement of GTP-binding proteins. *J Cell Biol*, **111**, 2893-908.
- Grimwood, B.G., Hechemy, K. und Stevens, R.W. (1979) *Toxoplasma gondii*: purification of trophozoites propagated in cell culture. *Exp Parasitol*, **48**, 282-6.
- Gummadi, S.N. und Menon, A.K. (2002) Transbilayer movement of dipalmitoyl-phosphatidylcholine in proteoliposomes reconstituted from detergent extracts of endoplasmic reticulum. Kinetics of transbilayer transport mediated by a single flippase and identification of protein fractions enriched in flippase activity. *J Biol Chem*, **277**, 25337-43. Epub 2002 May 8.
- Güther, M.L., Masterson, W.J. und Ferguson, M.A. (1994) The effects of phenyl-methylsulfonyl fluoride on inositol-acylation and fatty acid remodeling in African trypanosomes. *J Biol Chem*, **269**, 18694-701.
- Güther, M.L. und Ferguson, M.A. (1995) The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, **14**, 3080-93.
- Güther, M.L., Prescott, A.R. und Ferguson, M.A. (2003) Deletion of the GPIdeAc gene alters the location and fate of glycosylphosphatidylinositol precursors in *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry*, **42**, 14532-40.
- Hardy, M.R. und Townsend, R.R. (1988) Separation of positional isomers of oligo-saccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3289-93.

- Helenius, J. und Aebi, M. (2002) Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during *N*-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol*, **13**, 171-8.
- Helenius, J., Ng, D.T., Marolda, C.L., Walter, P., Valvano, M.A. und Aebi, M. (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature*, **415**, 447-50.
- Higgins, J.A. (1982) Fine-structural changes in rat liver microsomes treated with phospholipase C. *J Cell Sci*, **53**, 211-25.
- Higgins, J.A. und Hutson, J.L. (1986) Probes of the distribution of phospholipids in endoplasmic reticulum membranes. *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 401.
- Higgins, J.A., Hitchin, B.W. und Low, M.G. (1989) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* as a probe for the distribution of phosphatidylinositol in hepatocyte membranes. *Biochem J*, **259**, 913-6.
- Ho, M. und White, N.J. (1999) Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol*, **276**, C1231-42.
- Holder, A.A. und Cross, G.A. (1981) Glycopeptides from variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. C-terminal location of antigenically cross-reacting carbohydrate moieties. *Mol Biochem Parasitol*, **2**, 135-50.
- Holder, A.A. (1983) Characterisation of the cross-reacting carbohydrate groups on two variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **7**, 331-8.
- Homans, S.W., Edge, C.J., Ferguson, M.A., Dwek, R.A. und Rademacher, T.W. (1989) Solution structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochemistry*, **28**, 2881-7.
- Hong, Y., Maeda, Y., Watanabe, R., Ohishi, K., Mishkind, M., Riezman, H. und Kinoshita, T. (1999) Pig-n, a mammalian homologue of yeast Mcd4p, is involved in transferring phosphoethanolamine to the first mannose of the glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem*, **274**, 35099-106.
- Hooper, N.M. (1997) Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin Chim Acta*, **266**, 3-12.
- Howard, S.P., Garland, W.J., Green, M.J. und Buckley, J.T. (1987) Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol*, **169**, 2869-71.
- Howell, T.W., Cockcroft, S. und Gomperts, B.D. (1987) Essential synergy between Ca²⁺ and guanine nucleotides in exocytotic secretion from permeabilized rat mast cells. *J Cell Biol*, **105**, 191-7.
- Howell, T.W. und Gomperts, B.D. (1987) Rat mast cells permeabilised with streptolysin O secrete histamine in response to Ca²⁺ at concentrations buffered in the micromolar range. *Biochim Biophys Acta*, **927**, 177-83.

- Hugo, F., Reichwein, J., Arvand, M., Kramer, S. und Bhakdi, S. (1986) Use of a monoclonal antibody to determine the mode of transmembrane pore formation by streptolysin O. *Infect Immun*, **54**, 641-5.
- Hutchinson, W.M. (1965) Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, **206**, 961.
- Hutchinson, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C. und Work, K. (1970) Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *British Medical Journal*, **1**, 142-144.
- Hyams, N.R. (1998) Untersuchungen zur Biosynthese der Glycosyl-Phosphatidyl-inositole von *Toxoplasma gondii* im zellfreien System. Diplomarbeit, *FB Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- Ikezawa, H. (2002) Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull*, **25**, 409-17.
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., Soldati, D. und Beck, E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, **285**, 1573-6.
- Kasahara, K. und Sanai, Y. (2000) Functional roles of glycosphingolipids in signal transduction via lipid rafts. *Glycoconj J*, **17**, 153-62.
- Kihn, L., Rutkowski, D. und Stinson, R.A. (1990) Incorporation of human liver and placental alkaline phosphatases into liposomes and membranes is via phosphatidylinositol. *Biochem Cell Biol*, **68**, 1112-8.
- Kimmel, J., Ogun, S.A., de Macedo, C.S., Gerold, P., Vivas, L., Holder, A.A., Schwarz, R.T. und Azzouz, N. (2003) Glycosylphosphatidyl-inositols in murine malaria: *Plasmodium yoelii yoelii*. *Biochimie*, **85**, 473-81.
- Kinoshita, T., Ohishi, K. und Takeda, J. (1997) GPI-anchor synthesis in mammalian cells: genes, their products, and a deficiency. *J Biochem (Tokyo)*, **122**, 251-7.
- Kinoshita, T. und Inoue, N. (2000) Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 632-8.
- Kodukula, K., Amthauer, R., Cines, D., Yeh, E.T., Brink, L., Thomas, L.J. und Udenfriend, S. (1992) Biosynthesis of phosphatidylinositol-glycan (PI-G)-anchored membrane proteins in cell-free systems: PI-G is an obligatory cosubstrate for COOH-terminal processing of nascent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4982-5.
- Köhler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D. und Roos, D.S. (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*, **275**, 1485-9.

- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M. und Cabib, E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*, **272**, 17762-75.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Leidich, S.D., Drapp, D.A. und Orlean, P. (1994) A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem*, **269**, 10193-6.
- Lingelbach, K. und Joiner, K.A. (1998) The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci*, **111**, 1467-75.
- Lisanti, M.P., Caras, I.W., Gilbert, T., Hanzel, D. und Rodriguez-Boulan, E. (1990) Vectorial apical delivery and slow endocytosis of a glycolipid-anchored fusion protein in transfected MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7419-23.
- Lisanti, M.P., Caras, I.W. und Rodriguez-Boulan, E. (1991) Fusion proteins containing a minimal GPI-attachment signal are apically expressed in transfected MDCK cells. *J Cell Sci*, **99**, 637-40.
- Low, M.G. und Finean, J.B. (1977) Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem J*, **167**, 281-4.
- Low, M.G. und Kincade, P.W. (1985) Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature*, **318**, 62-4.
- Low, M.G. (1989) The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, **988**, 427-54.
- Low, M.G. (1990) Degradation of glycosyl-phosphatidylinositol anchors by specific phospholipases. In Turner, A.J. (ed.) *Molecular and cell biology of membrane proteins - glycolipid anchors of cell-surface proteins*. Ellis Horwood Ltd., London, pp. 35-63.
- Low, M.G. (1992) Phospholipases that degrade the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. In Hooper, N.M. und Turner, A.J. (eds.), *Lipid modification of proteins*. Oxford University Press, Oxford, pp. 117-154.
- Maeda, Y., Watanabe, R., Harris, C.L., Hong, Y., Ohishi, K., Kinoshita, K. und Kinoshita, T. (2001) PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. *Embo J*, **20**, 250-61.
- Marechal, E. und Cesbron-Delauw, M.F. (2001) The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci*, **6**, 200-5.
- Marechal, E., Azzouz, N., de Macedo, C.S., Block, M.A., Feagin, J.E., Schwarz, R.T. und Joyard, J. (2002) Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. *Eukaryot Cell*, **1**, 653-6.

- Marechal, E., Azzouz, N., Mercier, C., Santos de Macedo, C., Block, M.A., Dubremetz, J.-F., Feagin, J.E., Cesbron-Delauw, M.-F., Schwarz, R.T. und Joyard, J. (2003) Synthesis of chloroplast galactolipids in Apicomplexan parasites (*Toxoplasma gondi* and *Plasmodium falciparum*). In Murata, N., Yamada, M., Nishida, I., Sekua, J. und Wada, H. (eds.), *Advanced Researches of Plant Lipids*. Kluwar Academic Publishers, The Netherlands.
- Masterson, W.J., Doering, T.L., Hart, G.W. und Englund, P.T. (1989) A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell*, **56**, 793-800.
- Masterson, W.J., Raper, J., Doering, T.L., Hart, G.W. und Englund, P.T. (1990) Fatty acid remodeling: a novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. *Cell*, **62**, 73-80.
- Mayor, S., Menon, A.K. und Cross, G.A. (1990a) Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. II. Lipid structures of phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J Biol Chem*, **265**, 6174-81.
- Mayor, S., Menon, A.K., Cross, G.A., Ferguson, M.A., Dwek, R.A. und Rademacher, T.W. (1990b) Glycolipid precursors for the membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. I. Can structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C sensitive and resistant glycolipids. *J Biol Chem*, **265**, 6164-73.
- McConville, M.J. und Ferguson, M.A. (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J*, **294**, 305-24.
- McDowell, W. und Schwarz, R.T. (1988) Lipid-mediated protein glycosylation: assembly of lipid-linked oligosaccharides and post-translational oligosaccharid trimming. In Brodbeck, U. und Bordier, C. (eds.), *Post-translational modifications of proteins by lipids*, pp. 99-118.
- McFadden, G.I., Reith, M.E., Munholland, J. und Lang-Unnasch, N. (1996) Plastid in human parasites. *Nature*, **381**, 482.
- McLeod, R., Muench, S.P., Rafferty, J.B., Kyle, D.E., Mui, E.J., Kirisits, M.J., Mack, D.G., Roberts, C.W., Samuel, B.U., Lyons, R.E., Dorris, M., Milhous, W.K. und Rice, D.W. (2001) Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan Fab I. *Int J Parasitol*, **31**, 109-13.
- Mehlhorn, H. und Piekarski, G. (1998) *Grundriß der Parasitenkunde*. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Menon, A.K., Mayor, S. und Schwarz, R.T. (1990a) Biosynthesis of glycosyl-phosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei*: involvement of mannosyl-phosphoryldolichol as the mannose donor. *Embo J*, **9**, 4249-58.

- Menon, A.K., Schwarz, R.T., Mayor, S. und Cross, G.A. (1990b) Cell-free synthesis of glycosyl-phosphatidylinositol precursors for the glycolipid membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. Structural characterization of putative biosynthetic intermediates. *J Biol Chem*, **265**, 9033-42.
- Menon, A.K., Eppinger, M., Mayor, S. und Schwarz, R.T. (1993) Phosphatidylethanolamine is the donor of the terminal phosphoethanolamine group in trypanosome glycosylphosphatidylinositols. *Embo J*, **12**, 1907-14.
- Menon, A.K. und Vidugiriene, J. (1994) Topology of GPI biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Braz J Med Biol Res*, **27**, 167-75.
- Menon, A.K. (1994) Structural analysis of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Methods Enzymol*, **230**, 418-42.
- Menon, A.K. (1995) Flippases. *Trends Cell Biol*, **5**, 355-60.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. und Doumbo, O.K. (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415**, 673-9.
- Milne, K.G., Field, R.A., Masterson, W.J., Cottaz, S., Brimacombe, J.S. und Ferguson, M.A. (1994) Partial purification and characterization of the *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol de-*N*-acetylase of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in African trypanosomes. *J Biol Chem*, **269**, 16403-8.
- Murakami, Y., Siripanyapinyo, U., Hong, Y., Kang, J.Y., Ishihara, S., Nakakuma, H., Maeda, Y. und Kinoshita, T. (2003) PIG-W is critical for inositol acylation but not for flipping of glycosylphosphatidylinositol-anchor. *Mol Biol Cell*, **14**, 4285-95. Epub 2003 Jun 13.
- Nagel, S.D. und Boothroyd, J.C. (1989) The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J Biol Chem*, **264**, 5569-74.
- Nakamura, N., Inoue, N., Watanabe, R., Takahashi, M., Takeda, J., Stevens, V.L. und Kinoshita, T. (1997) Expression cloning of PIG-L, a candidate *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol deacetylase. *J Biol Chem*, **272**, 15834-40.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L. und Pavesio, C.E. (1994) Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*, **80**, 91-8.
- Potasman, I., Araujo, F.G., Desmots, G. und Remington, J.S. (1986) Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J Infect Dis*, **154**, 650-7.
- Potasman, I., Araujo, F.G., Thulliez, P., Desmots, G. und Remington, J.S. (1987) *Toxoplasma gondii* antigens recognized by sequential samples of serum obtained from congenitally infected infants. *J Clin Microbiol*, **25**, 1926-31.
- Powell, S.K., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. und Rodriguez-Boulan, E. (1991) Targeting of transmembrane and GPI-anchored forms of N-CAM to opposite domains of a polarized epithelial cell. *Nature*, **353**, 76-7.

- Prusiner, S.B. (1996) Prions Prions Prions. . Springer Press, Berlin.
- Roberts, W.L., Myher, J.J., Kuksis, A., Low, M.G. und Rosenberry, T.L. (1988) Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem*, **263**, 18766-75.
- Rotmans, J., Duchenne, W., Linschooten, C., In't Veld, N. und Polderman, A. (1988) Comparative study of three immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies against *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **7**, 535-8.
- Saltiel, A.R. (1991) The role of glycosyl-phosphoinositides in hormone action. *J Bioenerg Biomembr*, **23**, 29-41.
- Saltiel, A.R. (1996) Structural and functional roles of glycosylphosphoinositides. *Subcell Biochem*, **26**, 165-85.
- Schenkman, S., Yoshida, N. und Cardoso de Almeida, M.L. (1988) Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, **29**, 141-51.
- Schmidt, H., Maier, E., Karch, H. und Benz, R. (1996) Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur J Biochem*, **241**, 594-601.
- Schofield, L. und Hackett, F. (1993) Signal transduction in host cells by a glycosyl-phosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*, **177**, 145-53.
- Schofield, L., Vivas, L., Hackett, F., Gerold, P., Schwarz, R.T. und Tachado, S. (1993) Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, **87**, 617-26.
- Schofield, L., Gerold, P., Schwarz, R.T. und Tachado, S. (1994) Signal transduction in host cells mediated by glycosylphosphatidylinositols of the parasitic protozoa, or why do the parasitic protozoa have so many GPI molecules? *Braz J Med Biol Res*, **27**, 249-54.
- Scholtzseck and Mehlhorn. (1973) *Naturw. Rundschau*, Vol. 26, p. 421.
- Schutzbach, J.S. und Zimmerman, J.W. (1992) Yeast dolichyl-phosphomannose synthase: reconstitution of enzyme activity with phospholipids. *Biochem Cell Biol*, **70**, 460-5.
- Seeber, F. und Boothroyd, J.C. (1996) *Escherichia coli* beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene*, **169**, 39-45.
- Shams-Eldin, H., Azzouz, N., Kedeas, M.H., Orlean, P., Kinoshita, T. und Schwarz, R.T. (2002) The GPII homologue from *Plasmodium falciparum* complements a *Saccharomyces cerevisiae* GPII anchoring mutant. *Mol Biochem Parasitol*, **120**, 73-81.

- Sharma, C.B., Babczinski, P., Lehle, L. und Tanner, W. (1974) The role of dolicholmonophosphate in glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **46**, 35-41.
- Sharma, D.K., Smith, T.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S. und Ferguson, M.A. (1997) Substrate specificity of the *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol de-*N*-acetylase of glycosylphosphatidylinositol membrane anchor biosynthesis in African trypanosomes and human cells. *Biochem J*, **328**, 171-7.
- Sharma, S.D., Mullenax, J., Araujo, F.G., Erlich, H.A. und Remington, J.S. (1983) Western Blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J Immunol*, **131**, 977-83.
- Smith, T.K., Milne, F.C., Sharma, D.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S. und Ferguson, M.A. (1997a) Early steps in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania major*. *Biochem J*, **326**, 393-400.
- Smith, T.K., Sharma, D.K., Crossman, A., Dix, A., Brimacombe, J.S. und Ferguson, M.A. (1997b) Parasite and mammalian GPI biosynthetic pathways can be distinguished using synthetic substrate analogues. *Embo J*, **16**, 6667-75.
- Smith, T.K., Sharma, D.K., Crossman, A., Brimacombe, J.S. und Ferguson, M.A. (1999) Selective inhibitors of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway of *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, **18**, 5922-30.
- Stevens, V.L. und Raetz, C.R. (1991) Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants. *J Biol Chem*, **266**, 10039-42.
- Stochaj, U., Flocke, K., Mathes, W. und Mannherz, H.G. (1989) 5'-Nucleotidases of chicken gizzard and human pancreatic adenocarcinoma cells are anchored to the plasma membrane via a phosphatidylinositol-glycan. *Biochem J*, **262**, 33-40.
- Striepen, B., Tomavo, S., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1991) The "low molecular weight antigen" of *Toxoplasma gondii* is a family of glycosylphosphatidylinositol lipids. *Biological Chemistry, Hoppe-Seyler*, **372**, 765.
- Striepen, B., Tomavo, S., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1992) Identification and characterisation of glycosyl-inositolphospholipids in *Toxoplasma gondii*. *Biochem Soc Trans*, **20**, 296S.
- Striepen, B. (1995) Struktur, Biosynthese und Antigenität der Glycosyl-Phosphatidylinositole von *Toxoplasma gondii*. Doktorarbeit, *FB Biologie*. Philipps-Universität, Marburg.
- Striepen, B., Zinecker, C.F., Damm, J.B., Melgers, P.A., Gerwig, G.J., Koolen, M., Vliegthart, J.F., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1997) Molecular structure of the "low molecular weight antigen" of *Toxoplasma gondii*: a glucose alpha 1-4 *N*-acetylgalactosamine makes free glycosyl-phosphatidylinositols highly immunogenic. *J Mol Biol*, **266**, 797-813.

- Striepen, B., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1999) Glucosylation of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors: identification of uridine diphosphate-glucose as the direct donor for side chain modification in *Toxoplasma gondii* using carbohydrate analogues. *Biochemistry*, **38**, 1478-87.
- Stulnig, T.M., Berger, M., Sigmund, T., Raederstorff, D., Stockinger, H. und Waldhausl, W. (1998) Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J Cell Biol*, **143**, 637-44.
- Sundler, R., Alberts, A.W. und Vagelos, P.R. (1978) Phospholipases as probes for membrane sidedness. Selective analysis of the outer monolayer of asymmetric bilayer vesicles. *J Biol Chem*, **253**, 5299-304.
- Surolia, N. und Surolia, A. (2001) Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*. *Nat Med*, **7**, 167-73.
- Sütterlin, C., Escribano, M.V., Gerold, P., Maeda, Y., Mazon, M.J., Kinoshita, T., Schwarz, R.T. und Riezman, H. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* GPI10, the functional homologue of human PIG-B, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis. *Biochem J*, **332**, 153-9.
- Tachado, S.D., Gerold, P., McConville, M.J., Baldwin, T., Quilici, D., Schwarz, R.T. und Schofield, L. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol*, **156**, 1897-1907.
- Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R., Novakovic, S., McConville, M. und Schofield, L. (1997) Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4022-7.
- Tachado, S.D., Mazhari-Tabrizi, R. und Schofield, L. (1999) Specificity in signal transduction among glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.* *Parasite Immunol*, **21**, 609-17.
- Takahashi, M., Inoue, N., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., Endo, Y., Fujita, T., Takeda, J. und Kinoshita, T. (1996) PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *Embo J*, **15**, 4254-61.
- Tan, A., Bolscher, J., Feltkamp, C. und Ploegh, H. (1992) Retrograde transport from the Golgi region to the endoplasmic reticulum is sensitive to GTP gamma S. *J Cell Biol*, **116**, 1357-67.

- Tomavo, S., Schwarz, R.T. und Dubremetz, J.F. (1989) Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol Cell Biol*, **9**, 4576-80.
- Tomavo, S., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1992a) Biosynthesis of glycolipid precursors for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in a *Toxoplasma gondii* cell-free system. *J Biol Chem*, **267**, 21446-58.
- Tomavo, S., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1992b) Cell-free synthesis of glycolipid candidate precursor(s) for glycosyl-phosphatidylinositol anchors of *Toxoplasma gondii* surface proteins. *Biochem Soc Trans*, **20**, 166S.
- Tomavo, S., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1992c) A family of glycolipids from *Toxoplasma gondii*. Identification of candidate glycolipid precursor(s) for *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *J Biol Chem*, **267**, 11721-8.
- Tomavo, S., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1993) Structural analysis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface glycoprotein gp23. *Biol Cell*, **78**, 155-62.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4.
- Treumann, A., Lifely, M.R., Schneider, P. und Ferguson, M.A. (1995) Primary structure of CD52. *J Biol Chem*, **270**, 6088-99.
- Tschodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U., Ugochukwu, G., Buckley, J.T. und Peters, R. (1996) Optical single-channel analysis of the aerolysin pore in erythrocyte membranes. *Biophys J*, **70**, 723-32.
- Urakaze, M., Kamitani, T., DeGasperi, R., Sugiyama, E., Chang, H.M., Warren, C.D. und Yeh, E.T. (1992) Identification of a missing link in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in mammalian cells. *J Biol Chem*, **267**, 6459-62.
- van Meer, G. (1986) The lipid bilayer of the ER. *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 194-195.
- Vidugiriene, J. und Menon, A.K. (1993) Early lipid intermediates in glycosylphosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J Cell Biol*, **121**, 987-96.
- Vidugiriene, J. und Menon, A.K. (1994) The GPI anchor of cell-surface proteins is synthesized on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **127**, 333-41.
- Vidugiriene, J., Sharma, D.K., Smith, T.K., Baumann, N.A. und Menon, A.K. (1999) Segregation of glycosylphosphatidylinositol biosynthetic reactions in a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **274**, 15203-12.

- Vijaykumar, M., Naik, R.S. und Gowda, D.C. (2001) *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem*, **276**, 6909-12. Epub 2001 Jan 10.
- Vollmer, T.L., Waldor, M.K., Steinman, L. und Conley, F.K. (1987) Depletion of T-4+ lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system: a model of superinfection in AIDS. *J Immunol*, **138**, 3737-41.
- Waller, R.F., Keeling, P.J., Donald, R.G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A.F., Besra, G.S., Roos, D.S. und McFadden, G.I. (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12352-7.
- Waller, R.F., Ralph, S.A., Reed, M.B., Su, V., Douglas, J.D., Minnikin, D.E., Cowman, A.F., Besra, G.S. und McFadden, G.I. (2003) A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 297-301.
- Watanabe, R., Kinoshita, T., Masaki, R., Yamamoto, A., Takeda, J. und Inoue, N. (1996) PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **271**, 26868-75.
- Watanabe, R., Inoue, N., Westfall, B., Taron, C.H., Orlean, P., Takeda, J. und Kinoshita, T. (1998) The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *Embo J*, **17**, 877-85.
- Watanabe, R., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N. und Kinoshita, T. (1999) Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are *N*-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-*N*-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem J*, **339**, 185-92.
- Watanabe, R., Murakami, Y., Marmor, M.D., Inoue, N., Maeda, Y., Hino, J., Kangawa, K., Julius, M. und Kinoshita, T. (2000) Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2. *Embo J*, **19**, 4402-11.
- White, D.A. (1973) The phospholipid composition of mammalian tissues. In Ansell, G.B., Hawthorne, J.N. und Dawson, R.M.C. (eds.), *Form and Function of Phospholipids*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 441-482.
- Wichroski, M.J., Melton, J.A., Donahue, C.G., Tweten, R.K. und Ward, G.E. (2002) *Clostridium septicum* alpha-toxin is active against the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* and targets members of the SAG family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface proteins. *Infect Immun*, **70**, 4353-61.

- Wilson, S.P. und Kirshner, N. (1983) Calcium-evoked secretion from digitonin-permeabilized adrenal medullary chromaffin cells. *J Biol Chem*, **258**, 4994-5000.
- Yamashita, K., Mizuochi, T. und Kobata, A. (1982) Analysis of oligosaccharides by gel filtration. *Methods Enzymol*, **83**, 105-26.
- Zinecker, C.F., Striepen, B., Tomavo, S., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (1998) The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. *Mol Biochem Parasitol*, **97**, 241-6.
- Zinecker, C.F., Striepen, B., Geyer, H., Geyer, R., Dubremetz, J.F. und Schwarz, R.T. (2001) Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen 1 (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, **116**, 127-35.

Danksagung

Diese Arbeit habe ich in der Arbeitsgruppe Parasitologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. T. Schwarz gefertigt.

Sie wurde durch den Sonderforschungsbereich 286, den Fonds der Chemischen Industrie, die Stiftung P. E. Kempkes, das Hessische Ministerium für Wissenschaft und Kunst und die projektbezogene Förderung des wissenschaftlichen Austausches mit Frankreich (PROCOP) durch den Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) unterstützt.

Ein besonderer Dank gilt der Hessischen Graduierten Förderung für die Vergabe eines Promotionsstipendiums.

Herrn Prof. Dr. Ralph T. Schwarz danke ich herzlich für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten, sein stetes Interesse über den Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung und Loyalität auch in schwierigen Abschnitten dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach danke ich für die Vertretung dieser Arbeit gegenüber dem Fachbereich Biologie.

Dr. Jean-François Dubremetz danke ich für die Überlassung verschiedener Antikörper gegen *T. gondii* Proteine und Glycolipide und die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie. Dr. Frank Seeber danke ich für die Überlassung des *T. gondii* Stammes RHβ-1 und Dr. James Bangs für die Antikörper gegen *T. brucei* BiP.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Parasitologie danke ich für ihren Teamgeist, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, vor allem in schwierigen Phasen meiner Arbeit. Hervorheben möchte ich hier Dr. Peter Gerold für die Betreuung zu Beginn der Arbeit und Dr. Nahid Azzouz, Dr. Hosam Shams-Eldin und Dr. Cristiana Santos de Macedo, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Weiterhin gilt mein besonderer Dank Marlies Trampe, Jörg Schmidt und Ulrike Bieker für die Hilfe bei der Parasitenzucht und weitere Unterstützung.

Dankbar bin ich Freunden und Bekannten für die Ablenkung in den Stunden "Zwischendurch".

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Isabelle und meinen Kindern Jannis und Alina für ihre stete Unterstützung und Aufheiterung und besonders für ihr Verständnis mich häufig entbehren zu müssen.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

Untersuchungen zur Topologie der Glycosylphosphatidyl- inositol-Biosynthese in *Toxoplasma gondii*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 21.07.2004