

Isoenzym-Analysen zur Differenzierung von *Toxoplasma gondii*-Isolaten

Gabriela Barnert, A. Hassl, H. Aspöck

Einleitung

Toxoplasma gondii ist ein kosmopolitisch verbreiteter Parasit, von dem zahlreiche Stämme verschiedener Herkunft — sowohl geographisch wie auch von der Wirtsspezies her betrachtet — isoliert worden sind. Vergleichende Untersuchungen über die biologischen Eigenschaften im allgemeinen und über die Pathogenität in verschiedenen Wirtstieren haben gezeigt, daß diese Stämme außerordentlich unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (6, 7, 18). Dennoch lassen sich trotz dieser großen biologischen Vielfalt keine morphologischen Unterschiede feststellen, — die Stämme sind mit optischen Hilfsmitteln nicht zu differenzieren. Bei dem Bemühen, objektivierbare Differenzierungskriterien zu finden, bot es sich an, nach stammspezifischen Unterschieden in den Enzymmustern zu suchen. Erste Arbeiten haben auch gezeigt, daß Isoenzymmuster tatsächlich für die Differenzierung bestimmter Stämme geeignet sind (1, 3).

In der vorliegenden Studie wird über weitere Ergebnisse dieser Untersuchungen berichtet. Sie befaßt sich mit der Frage der Differenzierung von sechs, in vielen Laboratorien der Welt propagierten *Toxoplasma gondii*-Stämmen mittels Isoenzym-Analysen. Besonderes Augenmerk haben wir auch der Frage der genetischen Distanz, d. h. dem Maß der phylogenetischen Entfernung, der untersuchten *Toxoplasma*-Isolate gewidmet.

Material und Methoden

Die folgenden sechs *Toxoplasma gondii*-Isolate wurden untersucht: RH (13), BK (2), 928 (Daten über die Isolierung: Dr. Overdule/Utrecht, pers. Mitt.) KB (11), T (Herkunft: unbekannt) und ALT (17).

Die Kultivierung der Parasiten, die Herstellung der Kontroll-Lysate, die Präparation der *Toxoplasma*-Extrakte, sowie die Technik der Isoelektrischen Fokussierung wurden an anderer Stelle genau beschrieben (1). Der Proteingehalt aller Lysate wurde auf 4 mg/ml eingestellt.

Die Stämme wurden auf folgende 18 Enzyme untersucht (in Klammern: Internat. Abkürzung und Enzym-Klassifizierungsnummer): Alkohol-Dehydrogenase (ADH; E.C.1.1.1.1), L-Lactat-Dehydrogenase (LDH; E.C.1.1.1.27), Malat-Dehydrogenase (MDH; E.C.1.1.1.37), Malatenzym (ME; E.C.1.1.1.40), Isocitrat-Dehydrogenase (IDH; E.C.1.1.1.42), 6-Phosphat-Gluconat-Dehydrogenase (6PG; E.C.1.1.1.44), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P; E.C.1.1.1.49), Indophenol-Oxidase (IPO; E.C.1.15.1.1), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT; E.C.2.6.1.1), Hexokinase

(HEX; E.C.2.7.1.1), Phosphogluco-Mutase (PGM; E.C.2.7.5.1), Esterase (EST; E.C.3.1.1.1), alkalische Phosphatase (ALP; E.C.3.1.3.1), saure Phosphatase (ACP; E.C.3.1.3.2), Leucin-Aminopeptidase (LAP; E.C.3.4.1.1), Propionyl-Esterase (PE; E.C.3.1.1.1), Mannose-phosphat-Isomerase (MPI; E.C.5.3.1.8) und Phosphoglucose-Isomerase (PGI; E.C.5.3.1.9).

Die Lysate wurden im pH-Bereich von 3 - 10 aufgetrennt; jene Lysate, die für eine Auswertung mit den Enzymen IDH und MDH vorgesehen waren, wurden im pH-Bereich von 4 - 6,5 aufgetrennt. Die Rezepte zur spezifischen Enzymfärbung wurden Arbeiten von PERNIN (12) und von SELANDER et al. (14) entnommen. Alle Reaktionen wurden wiederholt durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Die Bestimmung der Isoelektrischen Punkte (pI) der Isoenzymbanden erfolgte mittels einer pH-Oberflächen-elektrode (1).

Die Reaktionsmuster der verschiedenen Isolate wurden in Gruppen geordnet, wobei das Isoenzymprofil des Isolats RH als Referenz diente.

Die Berechnung der genetischen Distanzen der *Toxoplasma*-Isolate erfolgte nach der von NEI (1971) publizierten Formeln (10).

Ergebnisse

Neun Enzyme ergaben deutlich erkennbare und reproduzierbare Bandenmuster: LDH, MDH, G6P, HEX, PGM, ALP, ACP, EST und PGI. Diese Enzyme konnten zur Charakterisierung der *Toxoplasma gondii*-Isolate herangezogen werden. Die anderen Enzyme (ADH, ME, IDH, 6PG, IPO, GOT, LAP, PE und MPI) zeigten entweder eine schlechte optische Auflösung der Banden, oder aber geringe bis keine Aktivität mit den Lysaten, sie wurden daher in unsere Studie nicht mehr weiter einbezogen.

Die Zuordnung der Enzyme zu den Enzymklassen und die Gruppierung der Isolate nach ihren Reaktionsmustern werden in Tabelle 1 gezeigt.

In Abbildung 1 werden die errechneten genetischen Distanzen der *Toxoplasma*-Isolate dargestellt.

TABELLE 1
Zuordnung der Enzyme zu den Enzymklassen und Reaktionsmuster der
Toxoplasma gondii-Isolate, in Gruppen geordnet
(Isolat RH = Referenzisolat)

Stamm	Oxidoreduktasen			Transferasen		Hydrolasen			Isomerasen
	LDH	MDH	G6P	HEX	PGM	ALP	ACP	EST	PGI
RH	A	A	A	A	A	A ₁	A	A	A
BK	B ₁	B ₁	B ₁	A	A	A ₁	A	B ₁	A
928	B ₂	B ₂	B ₂	A	A	B	B	B ₂	A
T	B ₂	B ₂	B ₂	A	A	A ₁	B	B ₂	A
ALT	C	C	C	A	A	A ₂	A	B ₁	A
KB	D	D	D	B	B	C	C	B ₂	A

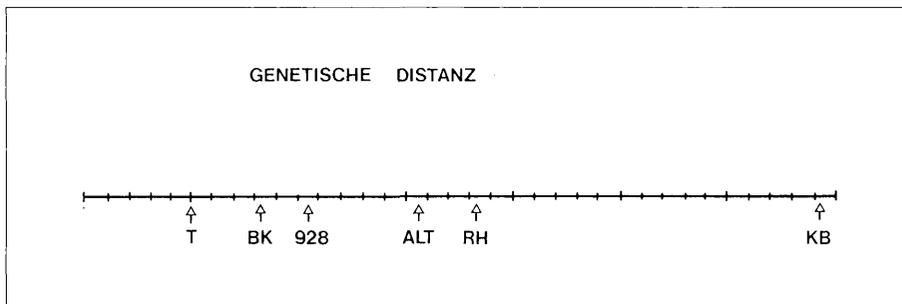


Abb. 1: Darstellung der genetischen Distanzen der untersuchten *Toxoplasma gondii*-Isolate

Diskussion

Isoenzym-Analysen finden in den letzten Jahren vermehrt Anwendung, um phylogenetische Beziehungen von Taxa verschiedener systematischer Ebenen feststellen zu können (5, 8, 15). Mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung, welche die Isoelektrischen Punkte der Isoenzyme bestimmt, konnten solche taxonomischen Studien bereits an mehreren Parasiten, z. B. an Trypanosomen (4, 9) und an Trematoden (16), erfolgreich durchgeführt werden. Die Isoelektrische Fokussierung erwies sich überdies auch als sehr gut geeignet, um morphologisch nicht unterscheidbare *Toxoplasma*-Isolate zu differenzieren (1, 3). Allerdings wurde noch keine Studie durchgeführt, um die genetischen Distanzen von verschiedenen Maus-virulenten *Toxoplasma gondii*-Isolaten zu ermitteln.

Wir konnten zeigen, daß von den neun Enzymen, die eine hohe Aktivität und eine klare optische Auflösung zeigten, acht Enzyme unterschiedliche Isoenzym-Morphen ausbildeten. In der Enzymklasse der Oxidoreduktasen wurden im Isoenzymmuster von LDH, MDH und G6P größere Unterschiede, die sich in insgesamt vier gut definierbaren Morphen manifestierten, beobachtet.

Die *Toxoplasma*-Isolate BK, 928 und T bildeten zwar in dieser Enzymklasse ein identisches Isoenzymmuster aus; es konnten jedoch erhebliche Intensitätsunterschiede der Banden beobachtet werden, weshalb wir die Muster mit B₁ und B₂ bezeichneten. Auffällig war außerdem, daß alle *Toxoplasma*-Isolate hinsichtlich der Enzyme LDH, MDH und G6P ein gleichartiges Isoenzymprofil zeigten. Da alle drei Enzyme derselben Enzymklasse angehören, könnte diese Beobachtung auf eine genetische Koppelung der drei Enzyme hinweisen. In der Enzymklasse der Hexokinasen bildeten die saure und die alkalische Phosphatase drei unterschiedliche Morphen aus. Hinsichtlich der Transferasen konnten innerhalb der untersuchten Stämme zwei Muster differenziert werden. In den Enzymklassen der Oxidoreduktasen, der Transferasen und der Hydro-lasen (mit Ausnahme des Enzyms Esterase) wies das *Toxoplasma*-Isolat KB von den anderen Isolaten auffällig abweichende Isoenzymmuster auf. Diese Abweichung konnten wir mit keiner uns bekannten Eigenschaft korrelieren; außerdem findet diese Abweichung auch in der ermittelten genetischen Distanz ihren Niederschlag (Abb. 1). Hingegen ist die im Isoenzymmuster manifestierte genetische Distanz der fünf anderen, biologisch durchaus unterschiedlichen Stämme (T, BK, 928, ALT und RH) sehr gering.

Wenn wir auch keinen Zusammenhang zwischen den bekannten biologischen Eigenschaften der untersuchten *Toxoplasma*-Isolate und ihrer Isoenzymmuster fanden, so konnte neuerlich gezeigt werden, daß Isoenzym-Analysen zur Charakterisierung von *Toxoplasma gondii*-Isolaten beitragen, und darüberhinaus auch Informationen über phylogenetische Zusammenhänge liefern.

Zusammenfassung

Die Tachyzoiten-Lysate von sechs physiologisch unterschiedlichen *Toxoplasma gondii*-Isolaten (RH, BK, T, 928, ALT und KB) wurden mit Hilfe einer Isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen einer Isoenzym-Analyse unterzogen. Von 18 untersuchten Enzymen konnten neun Enzyme (LDH, MDH, G6P, HEX, PGM, ALP, ACP, EST, und PGI) zur Charakterisierung der *Toxoplasma*-Isolate herangezogen werden. Aufgrund der erhobenen elektrophoretischen Daten wurden die genetischen Distanzen der sechs Isolate berechnet.

Es konnte gezeigt werden, daß — mit Ausnahme der Phosphoglucose-Isomerase — die oben genannten Enzyme unterschiedliche Isoenzymmuster in den untersuchten *Toxoplasma*-Isolaten ausbilden, die zu einer Gruppierung der Isolate genützt werden kann. Fünf der Isolate weisen eine relativ geringe genetische Distanz auf, während ein Stamm, KB, offensichtlich weit außerhalb dieser Gruppe steht.

Schlüsselwörter

Toxoplasma gondii, Isoenzym-Analyse, Isolat-Differenzierung.

Summary

Differentiation of *Toxoplasma gondii* isolates by isoenzyme analysis

The tachyzoite lysates of six physiologically different *Toxoplasma gondii* isolates (RH, BK, T, 928, KB, and ALT) were subjected to isoenzyme analysis using isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Of the 18 enzymes examined, 9 (LDH, MDH, G6P, HEX, PGM, ALP, ACP, EST, and PGI) were selected for the characterization of the *Toxoplasma gondii* isolates. The electrophoretic data ascertained were used to calculate the genetic distances of the isolates.

It could be shown that, with the only exception of phosphoglucose isomerase, all the above mentioned enzymes form different isoenzyme patterns in the *Toxoplasma gondii* isolates examined, thus making a grouping of the isolates possible. Five of the isolates show a relatively small genetic distance, whereas one strain, KB, stands out of this group.

Key words

Toxoplasma gondii, isoenzyme analysis, differentiation of isolates.

Danksagung

Herrn Dr. J. P. Overdulve (Utrecht) danken wir für die freundliche Überlassung der *Toxoplasma*-Isolate 928 und KB.

Literatur

1. BARNERT, G., HASSL, A., ASPÖCK, H. (1988): Isoenzyme studies on *Toxoplasma gondii* isolates using isoelectric focusing. Zbl. Bakt. Hyg. A 268, 476 - 481.
2. BINKHORST, C. D. (1948): Toxoplasmosis, a clinical, serological and histopathological study with special reference to the eye manifestations. Thesis, Leiden, pp. 82.

3. DARDE, M. L., BOUTEILLE, B., PESTRE-ALEXANDRE, M. (1987):
Differentiation iso-enzymatique de 7 souches de *Toxoplasma gondii* par iso-electrofocalisation en gel de polyacrylamide.
Bull. Soc. F. Parasitol. 5, 33 - 39.
4. EBERT, F. (1982):
The use of isoelectrofocusing in thin layer polyacrylamide and agarose gels as a method for the characterization of Venezuelan *Trypanosoma cruzi* stocks.
Tropenmed. Parasitol. 33, 63 - 67.
5. FUKUMOTO, S., NAGAI, D., YAZAKI, S., KAMO, H., YAMAGUCHI, T. (1988):
The molecular phylogenetic tree of the genus *Trichinella* constructed from isozyme patterns.
Parasitol. Res. 74, 574 - 580.
6. JACOBS, L. (1956):
Propagation, morphology and biology of *Toxoplasma*.
Ann. NY Acad. Sci. 64, 154.
7. KAUFMAN, H. E., REMINGTON, J. S., JACOBS, L. (1958):
Toxoplasmosis: The nature of virulence.
Amer. J. Ophthalm. 46, 255 - 261.
8. MELONI, B. P., LYMBERY, A. J., THOMPSON, R. C. A. (1988):
Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 38, 65 - 73.
9. MOHAMED, H. A., MOLYNEUX, D. H., SCOTT, C. M. (1987):
Isoenzyme characterization of trypanosomes of the subgenus *Herpetosoma*.
Parasitology 94, 39 - 48.
10. NEI, M. (1971):
Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity.
Amer. Naturalist 105, 385 - 398.
11. OVERDULVE, J. P. (1978):
Excretion of *Toxoplasma gondii* by non-immunized and immunized cats; its role in the epidemiology of Toxoplasmosis.
Proc. Koninkl. Ned. Akad. van Wetenschappen, Amsterdam, Ser. C 81, 1 - 18.
12. PERNIN, P. (1984):
Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic thermophilic *Naegleria* strains by isoelectric focusing.
Int. J. Parasitol. 14, 459 - 465.
13. SABIN, A. B. (1941):
Toxoplasmic encephalitis in children.
J. Amer. med. Ass. 116, 801 - 807.
14. SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M., GILMOUR, M. N., WHITTAM, T. S. (1986):
Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.
Appl. Environ. Microbiol. 51, 873 - 884.
15. SIDENBERG, D. G., LACHANCE, M. A. (1986):
Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* populations and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt.
Int. J. Syst. Bacteriol. 36, 94 - 102.
16. VOLTZ, A., RICHARD, J. PESSON, B. (1987):
A genetic comparison between natural and laboratory strains of *Echinostoma* (Trematoda) by isoenzymatic analysis.
Parasitology 95, 471 - 477.
17. WERNER, H., EGGER, I. (1967):
Vergleichende Untersuchungen an zystenbildenden *Toxoplasma*-Stämmen.
Zbl. Bakt. Hyg. A 206, 259 - 266.
18. WITTE, H. M., PIEKARSKI, G. (1970):
Die Oocysten-Ausscheidung bei experimentell infizierten Katzen in Abhängigkeit vom *Toxoplasma*-Stamm.
Z. Parasitenk. 33, 358 - 360.

KORRESPONDENZADRESSE:

Cand. rer. nat. Gabriela Barnert
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Hygiene-Institut der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria