



# Charakterisierung des murinen Guanylat-bindenden Proteins 2 (mGBP2)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

M.Sc. Biochemie

**Elisabeth Kravets**

Düsseldorf 2012

aus dem Institut für  
Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf



Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. K. Pfeffer

Koreferent: Prof. Dr. L. Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2012





## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis.....	IIX
Abkürzungsverzeichnis .....	XI
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Interferon- $\gamma$ .....	2
1.2 GTP-bindende Proteine.....	12
1.3 Die Dynamin-Familie der großen GTP-bindenden Proteine .....	17
1.3.1 Dynamine .....	18
1.3.2 Mx-Proteine .....	21
1.4 IFN- $\gamma$ induzierbare p47 und p65 GTPasen.....	24
1.4.1 p47 GTPasen (immunity related GTPases).....	26
1.4.2 p65 Guanylat-bindende Proteine (GBPs) .....	33
1.4.2.1 Die physiologische Funktion der GBPs .....	38
1.5 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	41
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	53
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>55</b>
2.1 Bezugsquellennachweis .....	55
2.1.1 Chemikalien .....	55
2.1.2 Antikörper .....	58
2.1.3 Enzyme .....	59
2.1.4 Radiochemikalien.....	59
2.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	59
2.2 Geräte.....	60
2.3 Medien und Puffer.....	63
2.3.1 Zellkulturmedien und Zusätze .....	63
2.3.2 Stammlösungen und Puffer .....	63
2.3.3 Medien für die Zellkultur.....	69
2.3.4 Medien für die Bakterienkultur .....	69
2.4 Antibiotika.....	70
2.5 Bakterienstämme und Zelllinien .....	70
2.5.1 Bakterien- und Toxoplasmenstämme .....	70
2.5.2 Zelllinien .....	70
2.6 Primer.....	71
2.7 Plasmidvektoren .....	77
2.7.1 Ausgangsvektoren .....	77
2.7.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide .....	78

<b>2.8 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>81</b>
2.8.1 Allgemeine Zellkultur .....	81
2.8.2 Kultivierung von Zelllinien .....	81
2.8.3 Kultivierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten .....	81
2.8.4 Bestimmung der Zellzahl .....	82
2.8.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	82
2.8.6 Transfektion mittels Transfektionsreagenzien .....	82
2.8.7 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien .....	83
2.8.7.1 Virusproduktion mittels 293FT Zelllinie .....	83
2.8.7.2 Lentivirale Transduktion von Zielzellen (NIH 3T3, MEF) .....	84
2.8.8 Stimulation von Zellen .....	85
2.8.9 Immunfluoreszenz-Färbung .....	85
2.8.10 Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	85
2.8.11 <i>In vitro</i> Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	86
2.8.12 Bestimmung der Rekrutierungsraten von mGBP2 und mGBP2-Mutanten zur parasitophoren Vakuole (PV) von <i>T. gondii</i> .....	86
2.8.13 Bestimmung der <i>T. gondii</i> Proliferation .....	87
<b>2.9 Molekularbiologische Arbeitsmethoden</b> .....	<b>87</b>
2.9.1 Analytische Plasmidpräparation aus Bakterien .....	87
2.9.2 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien .....	87
2.9.3 Agarosegelelektrophorese .....	88
Analytische Agarosegelelektrophorese .....	88
Präparative Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion .....	88
Bestimmung von DNS-Fragmentgrößen .....	89
2.9.4 Enzymatische Behandlung von DNS .....	89
Restriktionsanalyse von DNS .....	89
Dephosphorylierung von DNS .....	90
2.9.5 Ligation von DNS-Molekülen .....	90
TOPO TA Cloning® Kit .....	91
2.9.6 Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien .....	91
2.9.7 Cryokonservierung von Bakterien .....	92
2.9.8 Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR .....	92
2.9.9 Mutagenese-PCR .....	94
<b>2.10 Protein-biochemische und biophysikalische Methoden</b> .....	<b>95</b>
2.10.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus eukaryotischen Zellen .....	95
2.10.2 Zellfraktionierung (ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit) .....	95
2.10.3 Zellfraktionierung mit Hilfe der Zuckergradienten-Zentrifugation .....	96
Herstellung des Sukrosergradienten .....	96
Herstellung von Zellysaten und Durchführung der Zuckergradienten-Zentrifugation	96
2.10.4 Expression und Isolierung von rekombinanten Proteinen aus bakteriellem Überexpressionssystem .....	97
Zellanzucht und -aufschluss .....	97
2.10.5 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie .....	98
2.10.6 Proteinanreicherung .....	98
Präzipitation von Protein durch Ammoniumsulfat .....	98
Proteinanreicherung mittels Konzentratoren .....	99
2.10.7 Größenausschluss-Chromatographie .....	99

2.10.8	Bestimmung des Oligomerisierungszustandes mittels Multi-Winkel-Licht-Streuung (SEC-MALS) .....	100
2.10.9	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	100
	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels des BCA-Tests .....	100
	Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch Absorptionsspektroskopie .....	101
2.10.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	101
2.10.11	Coomassie-Blau-Färbung von Protein-Gelen .....	102
	Konventionelle Coomassie R-250-Färbung .....	102
	Kolloidale Coomassie G-250-Färbung .....	102
2.10.12	Western Blot (Immunoblot) .....	102
2.10.13	Analyse von Lipid-Protein-Interaktionen .....	103
2.10.14	Immunpräzipitation .....	104
2.10.15	Analyse von Nukleotiden mittels reversed-phase HPLC .....	105
2.10.16	Fluoreszenztitrationen .....	106
2.10.17	Langsame Reaktionskinetik .....	106
<b>2.11</b>	<b>Computerprogramme</b> .....	<b>107</b>
2.11.1	Klonierungsstrategien .....	107
2.11.2	Sequenzvergleiche .....	107
2.11.3	Modellerstellung und Strukturvisualisierung .....	107
2.11.4	Statistische Auswertung .....	108
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>109</b>
<b>3.1</b>	<b>Überblick</b> .....	<b>109</b>
<b>3.2</b>	<b>Strukturmodelle von mGBP2</b> .....	<b>111</b>
<b>3.3</b>	<b>Biochemische Analysen von mGBP2</b> .....	<b>115</b>
3.3.1	Reinigung von mGBP2 Wildtyp und Mutanten .....	115
3.3.2	Nukleotidbindung .....	116
3.3.2.1	Bindungsaffinitäten von WT mGBP2 und mGBP2-GTPase-Mutanten .....	116
3.3.3	Kooperative Hydrolyse von GTP über GDP zu GMP .....	120
3.3.3.1	GTP-Hydrolyse von WT mGBP2 .....	120
3.3.3.2	GTP-Hydrolyse der mGBP2-GTPase-Mutanten .....	123
3.3.4	Nukleotidabhängige Oligomerisierung von WT mGBP2 und mGBP2-GTPase-Mutanten .....	126
3.3.4.1	Bindung von GTP $\gamma$ S, GDP und GMP .....	126
3.3.4.2	Bindung von GDP Aluminiumfluorid .....	129
<b>3.4</b>	<b>Subzelluläre Lokalisation von WT mGBP2 und GTPase-Mutanten</b> .....	<b>126</b>
3.4.1	Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe des ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits .....	134
3.4.2	Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe des Zuckergradienten .....	137
<b>3.5</b>	<b>Rolle von mGBP2 bei der Infektionsabwehr gegen <i>T. gondii</i></b> .....	<b>143</b>
3.5.1	Subzelluläre Lokalisation von WT mGBP2 und GTPase-Mutanten nach <i>T. gondii</i> Infektion .....	143
<b>3.6</b>	<b>Funktion der mGBP2-Domänen</b> .....	<b>149</b>
3.6.1	Die Isoprenylierungsmutante von mGBP2 .....	149
3.6.2	Die biochemischen Eigenschaften der Isoprenylierungsmutante von mGBP2 .....	149
3.6.2.1	Nukleotid-Bindungsaffinitäten von mGBP2-C586S .....	149

3.6.2.2	Kooperative Hydrolyse von mGBP2-C586S .....	151
3.6.2.3	Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2-C586S.....	152
3.6.3	Herstellung der Trunktionsmutanten von mGBP2 .....	153
3.6.4	Subzelluläre Lokalisation von Isoprenylierungs- und Trunktionsmutanten von mGBP2 .....	155
3.6.5	Subzelluläre Lokalisation von Isoprenylierungs- und Trunktionsmutanten von mGBP2 nach <i>T. gondii</i> Infektion .....	159
<b>3.7</b>	<b>Interaktionspartner von mGBP2 .....</b>	<b>168</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>175</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften von mGBP2 .....</b>	<b>176</b>
4.1.1	mGBP2 bindet die Guaninnukleotide mit unterschiedlichen Affinitäten .....	176
4.1.2	Die GTP-Hydrolyse von mGBP2 ist kooperativ .....	178
4.1.3	mGBP2 multimerisiert nukleotidabhängig .....	184
4.1.4	Strukturmodell von mGBP2 .....	188
<b>4.2</b>	<b>Biochemische Analyse von Mutanten in der GTPase-Domäne und an der Isoprenylierungsstelle.....</b>	<b>191</b>
4.2.1	Das konservierte Lysin 51 in der P-Schleife ist essentiell für alle Schritte des GTPase-Zyklus.....	191
4.2.2	Das Arginin 48 ist der „Arginin-Finger“ von mGBP2 .....	194
4.2.3	Die Glutaminsäure 99 in der Switch II Region ist notwendig für eine effiziente GMP-Produktion .....	197
4.2.4	Die konservierte Asparaginsäure 182 bestimmt die Spezifität für Guaninnukleotide .	198
4.2.5	Das Cystein 586 im CaaX Motiv hat keinen Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften von mGBP2.....	200
4.2.6	Der Mechanismus der Hydrolyse von GTP über GDP zu GMP durch mGBP2 .....	201
<b>4.3</b>	<b>Biologische Implikationen der biochemischen Eigenschaften von mGBP2 .....</b>	<b>203</b>
4.3.1	Intrazelluläre Lokalisation von mGBP2 und Mutanten .....	203
4.3.2	Funktion von mGBP2 in der zellulären Immunabwehr gegen <i>T. gondii</i> und Verhalten der mGBP2-Mutanten.....	213
4.3.3	Interaktionspartner von mGBP2 .....	226
<b>4.4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>229</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>231</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>233</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>235</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>279</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>281</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>285</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>287</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Weiterleitung und Regulation der Signalwege von IFN- $\gamma$ .	5
Abb. 1.2: Strukturen von Guanylat-bindenden Proteinen	14
Abb. 1.3: GTPase-Zyklus von GTP-bindenden Proteinen.	16
Abb. 1.4: Schematische Darstellung des universalen Switch Mechanismus	17
Abb. 1.5: Domänenstruktur von Mitgliedern der Dynamin-Familie der großen GTP-bindenden Proteine	18
Abb. 1.6: Oligomerisierung von humanem MxA.	23
Abb. 1.7: Expression der IFN-induzierbaren GTPasen Familien und anderer charakterisierter antimikrobieller Effektoren.	25
Abb. 1.8: Struktur-Funktionsbeziehungen innerhalb der GKS und GMS p47 GTPase-Subfamilien.	27
Abb. 1.9: Pathogen-spezifische Antworten der p47 GTPasen gegen Mikroorganismen, die unterschiedliche membranöse Kompartimente besetzen.	30
Abb. 1.10: Modell der Regulation von IRG Proteinen und ihre Funktion bei der Resistenz gegen <i>T. gondii</i> .	32
Abb. 1.11: Phylogenetischer Stammbaum der p65 mGBPs.	34
Abb. 1.12: Linearisiertes Schema der Drei-Domänen-Struktur von mGBP2.	35
Abb. 1.13: Die Triphosphat-Struktur von hGBP1.	38
Abb. 1.14: Lebenszyklus von <i>T. gondii</i> .	42
Abb. 1.15: Struktur von <i>T. gondii</i> .	44
Abb. 1.16: <i>T. gondii</i> -Wirtszell-Interaktionen.	46
Abb. 1.17: Kontrolle der pro-inflammatorischen Antworten während einer <i>T. gondii</i> Infektion.	51
Abb. 3.1: Aminosäure-Sequenz von mGBP2.	110
Abb. 3.2: Strukturmodelle von mGBP2.	112
Abb. 3.3: Wechselwirkungen der E- mit den G- und M-Domänen von mGBP2.	114
Abb. 3.4: Reinigung von His <sub>6x</sub> -markiertem mGBP2 WT Protein.	115
Abb. 3.5: Strukturformel von mant-GTP (n = 2) und mant-GDP (n = 1)	116
Abb. 3.6: Fluoreszenztitration von mant-GTP $\gamma$ S (A), mant-GDP (B) und mant-GMP (C) an mGBP2.	117
Abb. 3.7: Kinetik der Hydrolyse von GTP durch mGBP2.	121
Abb. 3.8: Produktverhältnis der Hydrolyse von GTP durch mGBP2.	122
Abb. 3.9: Konzentrationsabhängigkeit der Hydrolyse von GTP durch WT mGBP2.	123
Abb. 3.10: Externes GDP ist kein Substrat für mGBP2.	123
Abb. 3.11: Konzentrationsabhängigkeit der GTP-Hydrolyse durch mGBP2-Mutanten.	124

---

Abb. 3.12: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2. ....	127
Abb. 3.13: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2-GTPase-Mutanten. ....	128
Abb. 3.14: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von WT und GTPase-Mutanten von mGBP2. ....	130
Abb. 3.15: Expression der mGBP2-WT und GTPase-Mutanten nach stabiler Transduktion von mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	131
Abb. 3.16: Subzelluläre Lokalisation von endogenem mGBP2 Protein in primären MEFs und von GFP-mGBP2-WT in transduzierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	132
Abb. 3.17: Subzelluläre Lokalisation von mGBP2-GTPase-Mutanten in mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	134
Abb. 3.18: Fraktionierung von WT und GFP-Fusionsproteinen aus stabil exprimierenden mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs mit dem ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem-Merck). ....	136
Abb. 3.19: mGBP2 Verteilung korreliert mit intrazellulären Membranstrukturen in der Zellfraktionierung mit Hilfe eines Zuckergradienten. ....	138
Abb. 3.20: Ko-Lokalisation von mGBP2 mit Autophagosomen. ....	140
Abb. 3.21: Interaktion von mGBP2 mit Lipiden. ....	141
Abb. 3.22: Akkumulation von Autophagosomen um mGBP2 positive <i>T. gondii</i> PVMs. ....	142
Abb. 3.23: Subzelluläre Lokalisation von mGBP2 nach <i>T. gondii</i> Infektion. ....	144
Abb. 3.24: Subzelluläre Lokalisation der GTPase-Mutanten von mGBP2 nach Infektion mit <i>T. gondii</i> . ....	146
Abb. 3.25: Rekrutierungsraten des WT Proteins und der GTPase-Mutanten von mGBP2 nach Infektion mit dem ME49 Stamm von <i>T. gondii</i> . ....	147
Abb. 3.26: Schematisches Diagramm der biochemischen und immunologischen Eigenschaften der GTPase-Mutanten von mGBP2. ....	148
Abb. 3.27: Fluoreszenztitration der Bindung von mant-Nukleotiden an mGBP2-C586S. ....	150
Abb. 3.28: Konzentrationsabhängigkeit der Hydrolyse von GTP durch mGBP2-C586S. ....	151
Abb. 3.29: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2-C586S. ....	152
Abb. 3.30: Expression von GFP-mGBP2-WT und von GFP-mGBP2-C586S Isoprenylierungsmutante nach stabiler Transduktion von mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	153
Abb. 3.31: Herstellung und Expression von mGBP2 Trunkationsmutanten als N-terminale GFP-Proteine in mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	154
Abb. 3.32: Subzelluläre Lokalisation von trunkierten Mutanten von mGBP2 in mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	156
Abb. 3.33: Fraktionierung von GFP-Fusionsproteinen von WT und Trunkationsmutanten aus mGBP2 stabil exprimierenden mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs. ....	158
Abb. 3.34: Subzelluläre Lokalisation der Isoprenylierungs- und von Trunkationsmutanten von mGBP2 nach <i>T. gondii</i> Infektion. ....	161
Abb. 3.35: Assoziationsraten der GFP-Fusionsproteine von WT, der Isoprenylierungs- und der Trunkationsmutanten von mGBP2 nach Infektion mit dem ME49 Stamm von <i>T. gondii</i> . ..	162
Abb. 3.36: Assoziationsraten des WT Proteins und der Trunkationsmutanten von mGBP2 im Verlauf der Infektion mit <i>T. gondii</i> . ....	163

---

Abb. 3.37: Subzelluläre Lokalisation von WT und Trunktionsmutanten von mGBP2 32 h nach <i>T. gondii</i> Infektion. ....	165
Abb. 3.38: <i>T. gondii</i> Proliferation in WT und mit GFP, GFP-mGBP2-WT oder mit Trunktionsmutanten von mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs 32 h nach <i>T. gondii</i> Infektion. ....	166
Abb. 3.39: Einfluss von mGBP2 auf die Infektiosität von <i>T. gondii</i> .....	167
Abb. 3.40: Ko-Immünpräzipitation von GFP-mGBP2 und endogenem mGBP2. ....	169
Abb. 3.41: Ko-Lokalisation von HA-mGBP2 mit FLAG-mGBP2 in NIH 3T3 Fibroblasten und die Rekrutierung von HA-mGBP2 zu <i>T. gondii</i> . ....	170
Abb. 3.42: Ko-Immünpräzipitation von HA-mGBP2 und FLAG-mGBP2. ....	171
Abb. 3.43: Subzelluläre Lokalisation, Rekrutierung zu <i>T. gondii</i> und Immünpräzipitation von mGBPs mit HA-mGBP2 bzw. GFP-mGBP2. ....	172
Abb. 4.1: Konformationsänderungen des aktiven Zentrums, die durch die G-Domänen Dimerisierung und GTP-Hydrolyse von Dynamin induziert werden. ....	182
Abb. 4.2: Die katalytische Maschinerie, die bei hGBP1 GTP-Hydrolyse involviert ist. ....	185
Abb. 4.3: Sequenzalignment der $\alpha$ 6-Helix von hGBP1 und der putativen $\alpha$ 6-Helix von mGBP2. ....	185
Abb. 4.4: Strukturmodell von mGBP2. ....	189
Abb. 4.5: Strukturmodell der G-Domäne von mGBP2. ....	196
Abb. 4.6: Schematisches Modell der oligomerisierungsinduzierten GTPase-Aktivität von mGBP2. ....	202
Abb. 4.7: Alignment der C-terminalen Sequenzen von hGBP1 und mGBP2.....	211
Abb. 4.8: Y2H-Analyse der Interaktionen von mGBPs. ....	227





## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien. ....	69
Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Bakterienkulturmediums .....	69
Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika .....	70
Tabelle 2.4: Verwendete Bakterien-und Toxoplasmenstämme .....	70
Tabelle 2.5: Verwendete Zellen .....	71
Tabelle 2.6: Primer zur Klonierung von GFP-Fusionskonstrukten für GFP-mGBP2-WT .....	71
Tabelle 2.7: Primer zur Klonierung von trunkierten GFP-mGBP2-Fusionskonstrukten .....	72
Tabelle 2.8: Mutagenese-Primer zur Generierung von Punktmutanten von mGBP2 in pEGFP-C2 und pWPXL-GFP Vektoren.....	72
Tabelle 2.9: Primer zur Klonierung eines HA-mGBP2 Fusionskonstruktes in pWPI .....	73
Tabelle 2.10: Primer zur Klonierung eines FLAG-mGBP2 Fusionskonstruktes in pFLAG-CMV2..	73
Tabelle 2.11: pQE80L Primer zur Klonierung von His <sub>6x</sub> -Fusionskonstrukten .....	74
Tabelle 2.12: Klonierungs- und Mutagenese-Primer zur Generierung von Punktmutanten von mGBP1 (1.1) im pCR II TOPO-Vektor .....	75
Tabelle 2.13: Sequenzierungsprimer .....	76
Tabelle 2.14: Sequenzen von Oligonukleotiden und Sonden für Realtime RT-PCR Versuche.....	76
Tabelle 2.15: Verwendete Ausgangsvektoren.....	77
Tabelle 2.16: Hergestellte Plasmide .....	78
Tabelle 2.17: Restriktionsverdau .....	89
Tabelle 2.18: Standard-PCR-Ansatz.....	93
Tabelle 2.19: Programmierung unter Standard-PCR-Bedingungen.....	93
Tabelle 2.20: Standard-Mutagenese-PCR-Ansatz .....	94
Tabelle 2.21: Standard-Bedingungen für die Mutagenese-PCR-Programmierung .....	94
Tabelle 3.1: Fluoreszenztitration von mant-Nukleotiden nach der Bindung an mGBP2-WT und GTPase-Mutanten .....	118
Tabelle 3.2: Konzentrationsabhängigkeit der GTP-Hydrolyse durch mGBP2-WT und GTPase- Mutanten .....	125
Tabelle 3.3: Fluoreszenztitration von mant-Nukleotiden nach der Bindung an C586S- und mGBP2-WT. ....	150
Tabelle 3.4: Konzentrationsabhängigkeit der GTP-Hydrolyse durch mGBP2-C586S. ....	152
Tabelle 4.1: Vergleich der Nukleotidbindung von Proteinen der Dynamin-Familie .....	178
Tabelle 4.2: Vergleich der GTP-Hydrolyse von Proteinen der Dynamin-Familie.....	180



## Abkürzungsverzeichnis

AIDS	aquired immunodeficiency syndrome
ATP	Adenosintri-phosphat
BCR	B-Zell-Rezeptor
BH4	Tetrahydrobiopterin
BAG	Bradyzoite Antigen
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CCR5	Cystein-Cystein Chemokin-Rezeptors 5
CD	Cluster of Differentiation
cDC	konventionelle Dendritische Zelle
cDNS	DNS-Kopie der mRNA (komplementäre DNS)
CTIIA	MHCII Transaktivator
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes oder Milli-Q- (Millipore) Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dsRAD	dsRNS Adenosin Deaminase
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemoluminescence
ECMV	Encephalomyocarditis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EZ	Endothelzellen
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FTase	Farnesyltransferase
GAF	STAT1 Homodimer
GAS	IFN- $\gamma$ activated site
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GBP	Guanylat-bindendes Protein
GDI	Guanin-Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Austauschfaktor (guanine exchange factor)
GGTase I	Geranylgeranyltransferase I
GMP	Guanosinmonophosphat

---

GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HIF1	Hypoxie-induzierbaren Faktors 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HOCl	hypochlorige Säure
HSP	heat shock protein
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IFNGR	IFN- $\gamma$ Rezeptor
IL	Interleukin
IMDM	Iscove 's Modified Dulbecco 's Medium
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IPTG	IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
IRF	interferon regulatory factor
IRG	immunity-related GTPase
ISG	IFN stimulierte Gene
ISGF3	IFN-stimulated gene factor 3
ISRE	IFN-stimulated response elements
HDAC	Histondeacetylase
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
ko	knock-out
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scanning Microscopy
M	Molar
mant	2'/3'-O-(N'-Methyl-anthraniloyl)
MEF	muriner embryonaler Fibroblast
MMP	Matrix Metalloproteinasen
M $\Phi$	Makrophage
mant-GDP	mant-Guanosindiphosphat
mant-GMP	mant-Guanosinmonophosphat
mant-GppNHp	mant-Guanosin-[( $\beta$ , $\gamma$ )-imido]-triphosphat
mant-GTP $\gamma$ S	mant-Guanosin-[( $\gamma$ -thio)-imido]-triphosphat
MDR	Multidrug-Resistenzen
min	Minute(n)
MCS	multiple cloning site
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility complex)
mRNS	Boten-RNS (messenger RNA)
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
<i>Mtb</i>	<i>Mycobakterium tuberculosis</i>
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum

---

NF-κB	Nuclear factor-κB
NK	natürliche Killerzelle
NKS	Newborn-Calf-Serum
NO	Stickstoffmonoxid
NRAMP-1	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hyperoxidanion
2-5OAS	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase
ORF	offener Leserahmen
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
p.c.	post coitus
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PFA	Paraformaldehyd
Phox	Phagozyten Oxidase
PKR	dsRNS-abhängige Protein Kinase
PNÜ	postnukleärer Überstand
PRR	pattern recognition receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTP	Tyrosinphosphatase
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
RNI	reaktive Stickstoffintermediate
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion
SAG	Surface Antigen
SRS	SAG-related sequences
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEC-MALS	SEC-multi-angle light scattering (Multi-Winkel-Lichtstreuung)
SH2/3	Src homology 2/3
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SSH	suppression-subtractive hybridization
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
SUSA	SAG-unrelated surface antigens
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCR	T-Zell Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TVN	tubulo-vesikularäres Netzwerk
Ü/N	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute

v/v	Volumen/Volumen
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
Y2H	Yeast-two-Hybrid
ZNS	Zentralnervensystem

## 1 Einleitung

Das Immunsystem der Vertebraten ist ein komplexes Netzwerk aus zellulären und humoralen Bestandteilen. Es bietet Schutz gegen eine Vielzahl von Krankheitserregern und Schäden, die diese verursachen sowie vor weiteren schädlichen Substanzen, wie etwa von Toxinen von Pathogenen und Insekten (Janeway Immunologie, Murphy et al., 2009, S. 5). Die angeborene und die adaptive Immunität sind zwei ineinander greifende Mechanismen der Pathogenabwehr, die sich im Laufe der Evolution entwickelt haben.

Die adaptive Immunität vermittelt durch die Reifung und Expansion der B- und T-Zellen zelluläre und humorale Antwortmechanismen, die den Aufbau einer erregerspezifischen und effizienten Eliminierung der Pathogene ermöglicht. Durch diese Pathogenspezifität wird zusätzlich das „immunologische Gedächtnis“ aufgebaut, welches es dem Immunsystem bei wiederholten Infektionen oder nach präventiver Vakzinierung mit Hilfe von „Gedächtnis-“ Lymphozyten erlaubt wesentlich schnellere und effizientere Immunantworten auszulösen (Cellular and Molecular Immunology, Abbas et al., 2007, S. 4; Janeway Immunologie, Murphy et al., 2009, S. 36). Bei einer Erstinfektion benötigt die adaptive Immunantwort allerdings mehrere Tage, um die für die gezielte Eliminierung eines Pathogens nötige Spezifität und Effektivität aufzubauen (Janeway Immunologie, Murphy et al., 2009, Kapitel 1). In dieser Zeit stellt das angeborene oder native Immunsystem des infizierten Organismus die primäre anti-mikrobielle Verteidigungsfront dar und verhindert oder verzögert eine Ausbreitung der Infektion. Die angeborene Immunität wird direkt durch Krankheitserreger über die Erkennung von pathogen assoziierten molekularen Mustern (PAMP) aktiviert und verfügt über zelluläre und biochemische Abwehrmechanismen, mit denen sie in der Lage ist schnell gegen ein breites Spektrum von Infektionen zu reagieren und den Aufbau einer adaptiven Immunität zu initiieren (Janeway Immunologie, Murphy et al., 2009, S. 19). Das Epithelialgewebe der Haut, des gastrointestinalen und des respiratorischen Traktes ist die Hauptkomponente des angeborenen Immunsystems, welche für den eindringenden Keim zum einen die erste mechanische Barriere darstellt, zum anderen durch Oberflächen- und /oder sezernierte Proteine (Defensine) bereits aktiv anti-mikrobielle Verteidigungsmechanismen zur Verfügung stellt (Cellular and Molecular Immunology, Abbas et al., 2007, S. 4). Weiterhin spielt das Komplementsystem, bestehend aus einer Anzahl löslicher Proteine, eine wichtige Rolle sowohl bei der Rekrutierung von

inflammatorischen Zellen zum Erreger (Chemoattraktion), als auch bei der direkten Lyse von Bakterien, Viren und Eukaryoten (Cellular and Molecular Immunology, Abbas et al., 2007, S. 4). Zentrale Elemente des angeborenen Immunsystems sind jedoch dessen zelluläre Komponenten, bestehend aus Phagozyten, natürlichen Killerzellen (NK) und weiteren inflammatorischen Zellen, die bereits vor der Initiation einer adaptiven Immunabwehr starke anti-mikrobielle Effektormechanismen bereitstellen und somit ausschlaggebend zur Eliminierung der Pathogene oder zur Verzögerung der Infektionsausbreitung beitragen. Das Zusammenspiel dieser zellulären Komponenten wird durch Zytokine und Chemokine dirigiert, die als Signalstoffe Immunantworten regulieren können (Cellular and Molecular Immunology, Abbas et al., 2007, S. 4). Phagozyten, wie z. B. Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen ( $M\Phi$ ), stellen die entscheidende Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität dar und fungieren ebenso als wichtige Effektorzellen adaptiver Immunantworten. Daher ist für das Verständnis der Wirt-Pathogen Interaktionen im Rahmen einer Immunantwort die Erforschung von Wirkmechanismen und Effektormolekülen des angeborenen Immunsystems von besonderer Bedeutung, da diese den ersten Schritt zur Eliminierung des Pathogens darstellen. Interferone gehören dabei zu den wichtigsten Zytokinen bei der Pathogenabwehr.

## 1.1 Interferon- $\gamma$

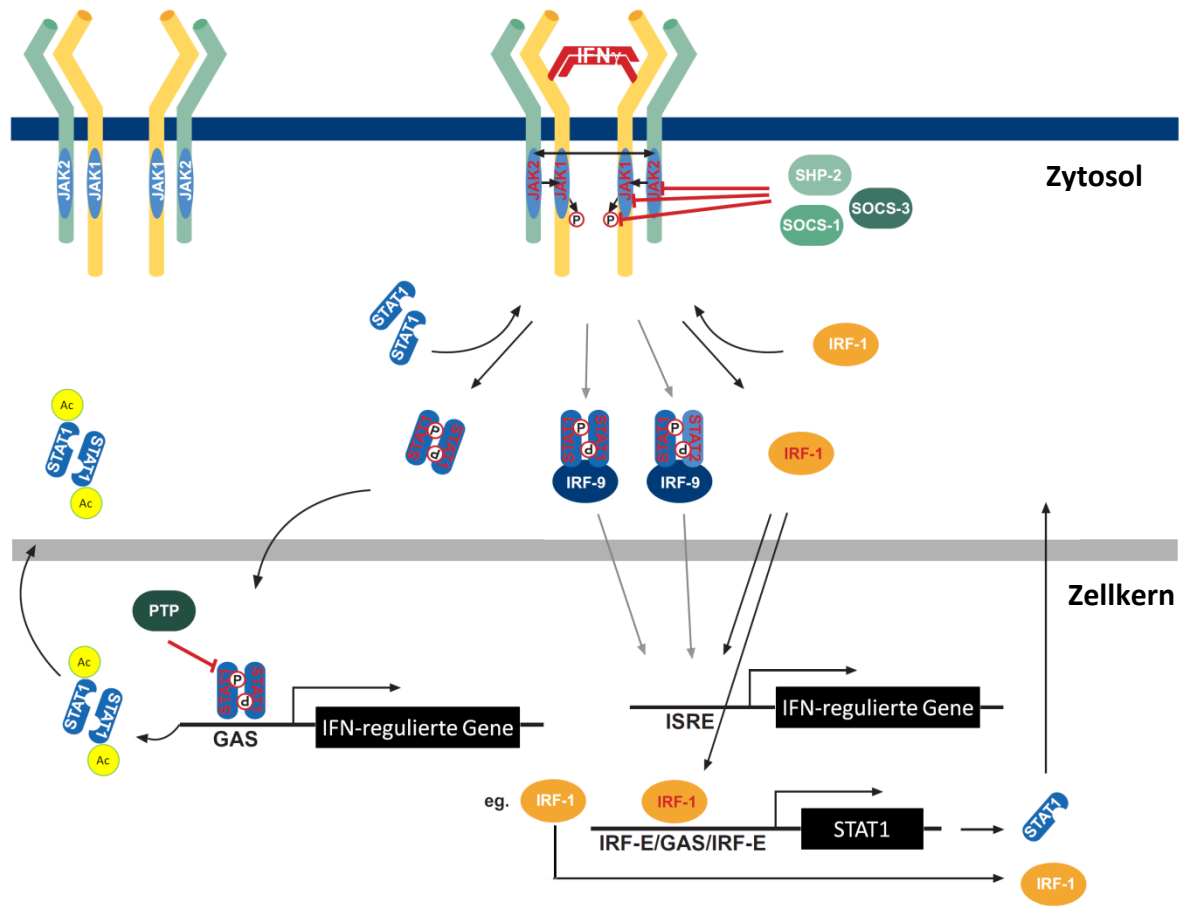
Interferone (IFN) sind Zytokine, die eine zentrale Rolle in der Immunabwehr der Säugetiere gegen Pathogene spielen. Sie wirken anti-mikrobiell, antiproliferativ und immunmodulatorisch. Typ I Interferone (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) werden unter anderem durch Virus infizierte Zellen sezerniert. Die Hauptquelle von Typ II Interferon (IFN- $\gamma$ ) sind, neben aktivierten  $CD4^+$   $T_H1$ -Zellen, NK-Zellen und  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen (Boehm et al., 1997). Weitere Subtypen der T-Zellen, wie  $T_H0$ -Zellen,  $T_{reg}$ -Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und auch NK-T-Zellen, sowie  $M\Phi$ , DCs und sogar B-Zellen sind ebenfalls in der Lage, IFN- $\gamma$  zu produzieren (Frucht et al., 2001; Szabo et al., 2003; Wagner et al., 2010). In NK- und T-Zellen wird IFN- $\gamma$  durch IL-12 und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induziert, die durch konventionelle DCs (cDCs) und  $M\Phi$  sekretiert werden (Bancroft et al., 1991; Paludan, 2000). Neben der ursprünglich beschriebenen direkten antiviralen Wirkung (Wheelock, 1965), reguliert IFN- $\gamma$  zahlreiche Aspekte der Immunantwort. IFN- $\gamma$  initiiert bakterizide Aktivitäten gegen Pathogene, unter anderem durch die Stimulation der



Antigen-Präsentation über Klasse I und II Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC). IFN- $\gamma$  reguliert die Synthese der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), induziert Faktoren der Komplementkaskade und spielt eine Rolle bei der T-Zell Polarisierung (Mosmann and Coffman, 1989) und der T-Zell vermittelten Immunität (Yang, Hardi et al., 1995). Außerdem moduliert IFN- $\gamma$  Leukozyten-Endothelium Interaktionen, hat einen Einfluss auf Apoptose und reguliert eine große Zahl von Genen (Coleman et al., 1994; Boehm et al., 1998), deren funktionelle Signifikanz noch nicht vollständig charakterisiert ist. Es ist bemerkenswert, dass eine solche Funktionsvielfalt durch die komplexe zellspezifische Regulation der Genexpression durch ein Zytokin initiiert wird. Mehrere der IFN- $\gamma$ -abhängig induzierten Gene fungieren als Transkriptionsfaktoren. Die IFN- $\gamma$  vermittelte zelluläre Antwort kann synergistisch oder antagonistisch mit Signalwegen interagieren, die durch andere Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-4 (IL-4) reguliert werden. Das Fehlen der durch IFN- $\gamma$  aktivierten zellulären Signalwege führt zur erhöhten Anfälligkeit von Mäusen gegenüber einem weiten Spektrum an Infektionserregern wie *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, Mykobakterien, *Toxoplasma gondii* und einigen Viren, wie z. B. Vaccinia, aber nicht Influenza Virus und zu einer erhöhten Letalität in der Sepsis (Cooper et al., 1993; Graham et al., 1993; Wang et al., 1994; Muller et al., 1994; Orange et al., 1995; Zantl et al., 1998). Weiterhin findet man bei IFN- $\gamma$  defizienten Mäusen eine Deregulation der Expansion bestimmter hämatopoetischer Vorläuferzelllinien (Murray et al., 1998). Beim Menschen wurde beobachtet, dass genetische Defekte in IFN- $\gamma$  Rezeptor (IFNGR) Genen zu Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit Mykobakterien, Toxoplasmen und Salmonellen führen (Huang et al., 1993; Dalton et al., 1993; Scharton-Kersten et al., 1996; Jouanguy et al., 1999; Ottenhoff et al., 2002; Filipe-Santos et al., 2006).

Im Gegensatz zu IFN- $\alpha$ , für das sowohl im Menschen als auch in der Maus 14 orthologe Gene existieren (Bogdan et al., 2004), kodiert ein Gen für IFN- $\gamma$ , das im Menschen auf Chromosom 12 und in der Maus auf Chromosom 10 lokalisiert ist (Pestka et al., 2004; Chen et al., 2004). IFN- $\gamma$  besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa und bildet in der biologisch aktiven Form ein nicht kovalent gebundenes Homodimer (Fountoulakis et al., 1992; Farrar and Schreiber, 1993). Der IFNGR wird auf den Oberflächen aller kernhaltigen Zellen exprimiert, jedoch mit unterschiedlicher Dichte. Der IFNGR ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei Ligand-bindenden IFNGR1 Untereinheiten (oder  $\alpha$ -Ketten) und zwei Signal-transduzierenden IFNGR2 Untereinheiten (oder  $\beta$ -Ketten) (Abb. 1.1). Jede dieser Rezeptoruntereinheiten ist konstitutiv mit einem Mitglied der Janus

Kinase (JAK) Familie assoziiert: IFNGR1 mit JAK1 und IFNGR2 mit JAK2 (Igarashi et al., 1994; Bach et al., 1997; Chen et al., 2004). Die Signaltransduktion startet mit der Bindung des IFN- $\gamma$  Homodimers an die beiden Ketten des IFNGR und initiiert eine Konformationsänderung und Dimerisierung der beiden IFNGR1 Untereinheiten (Greenlund et al., 1993). Die Konsequenz ist die Assoziation zweier IFNGR2 Untereinheiten an den IFN- $\gamma$ /IFNGR1-Komplex sowie die anschließende Auto- und Transphosphorylierung und reziproke Aktivierung der JAKs. Die aktivierten JAKs phosphorylieren die beiden IFNGR1 Ketten am Tyr440 in der zytoplasmatischen Domäne, wodurch zwei Andockstellen für die Src homology 2 (SH2) Domänen der latent im Zytosol vorhandenen Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) Moleküle entstehen (Greenlund et al., 1994; Heim et al., 1995). Die STAT1 Moleküle werden am Tyr701 phosphoryliert und dissoziieren vom Komplex, um Homodimere zu bilden (Greenlund et al., 1995; Prejean and Colamonici, 2000; Ramana et al., 2002). Das STAT1-Dimer gelangt in den Zellkern, wo es an bestimmte Promotorsequenzen, die als IFN- $\gamma$  activated site (GAS) bezeichnet werden, bindet. Die Bindung des Dimers an die DNS initiiert die Transkription der IFN-stimulierten Gene (ISGs). Einige STAT1 aktivierte Gene sind ebenfalls Transkriptionsfaktoren, wie der IFN regulated factor-1 (IRF-1) (Sims et al., 1993) und der MHC II Transaktivator (CTIIA), welche die Expression sekundär aktivierter Gene über die Bindung an IFN-stimulated response elements (ISRE) regulieren. GAS und ISRE Sequenzen sind häufig überlappend und Gene, die beide Promotorsequenzen enthalten, können primär oder sekundär reguliert werden. Die erste Induktion IFN regulierter Gene erfolgt 15-30 Minuten nach Stimulation (Kerr and Stark, 1991). Das aktivierte STAT1 wird anschließend im Zellkern durch die Histonacetyltransferase CBP acetyliert und durch die Phosphatase TCP45 dephosphoryliert. Das dephosphorylierte Dimer transloziert zurück ins Zytosol, wo es durch die Histondeacetylase (HDAC), HDAC3, deacetyliert und für den nächsten Zyklus der Phosphorylierung/Acetylierung bereit gestellt wird (Schroder et al., 2004; Hu and Ivashkiv, 2009) (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Weiterleitung und Regulation der Signalwege von IFN-γ.**

Ein Homodimer von IFN-γ führt zur Bildung eines Komplexes aus vier Rezeptoruntereinheiten (IFNGR1, gelb; IFNGR2, grün) mit vier assoziierten JAKs. Die aktivierten JAKs phosphorylieren jeweils eine Untereinheit des Rezeptors und schaffen dadurch Bindungsstellen für STAT1-Moleküle, die dann ebenfalls von den JAKs phosphoryliert werden. Die phosphorylierten STAT1-Moleküle dissoziieren vom Rezeptor und bilden ein Homodimer, das in den Zellkern transportiert wird und dort an GAS-Promotorsequenzen der Zielgene, darunter auch Transkriptionsfaktoren wie IRF-1 bindet und die Transkription aktiviert. Sekundäre Gene werden IRF-1 abhängig transkribiert, indem der Transkriptionsfaktor die ISRE-Promotorsequenzen aktiviert. Das IFN-γ Signaling führt daneben auch zur Ausbildung von STAT1:STAT1:IRF-9 und STAT1:STAT2:IRF-9 (ISGF3) Komplexen, die an ISRE-Promotorregionen binden. Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP), wie Shp2, dephosphorylieren die JAKs und IFNGR1. SOCS-1 und SOCS-3 interferieren mit der JAK Aktivität. Die STAT1 Aktivität wird durch Dephosphorylierung und Acetylierung im Zellkern herunterreguliert. Nach (Schroder et al., 2004) und (Hu and Ivashkiv, 2009).

Zur Beendigung der Signaltransduktion wird die Reduktion der phosphorylierten STAT1 Spezies mit Hilfe von suppressor of cytokine signaling (SOCS-1) Proteinen über den Ubiquitin-Proteasom-Weg in einem negativen „feed-back“-Mechanismus eingeleitet (Alexander et al., 1999). SOCS-1 defiziente Mäuse sterben an überschießender IFN-γ Signalweiterleitung, welche zu unkontrollierter Entzündung und Gewebeschädigung führt (Schroder et al., 2004). Auch SOCS-3, welches durch IFN-γ induziert wird, kann die IFN-γ abhängige Signalweiterleitung negativ regulieren (Song and Shuai, 1998). Tyrosin-

Phosphorylierung in der JH2 Domäne von JAK2 inhibiert die Zytokin-induzierte Signalweiterleitung (Feener et al., 2004). Zusätzlich werden JAK1, JAK2 und IFNGR1 durch die Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP), wie Shp2, dephosphoryliert (You et al., 1999). Der Ligand-Rezeptor-Komplex wird schließlich internalisiert und dissoziiert intrazellulär (Farrar and Schreiber, 1993). In den meisten Zellen wird die IFNGR1 Untereinheit zurück zur Zelloberfläche transportiert. In Fibroblasten wird internalisiertes IFN- $\gamma$  lysosomal degradiert (Anderson et al., 1983).

Die von IFN- $\gamma$  induzierte Signalkaskade kann über die Aktivierung des STAT1-STAT2-IRF-9 Komplexes, der auch als IFN-stimulated gene factor (ISGF3) bezeichnet wird, zum Teil mit dem von Typ I ( $\alpha/\beta$ ) IFN Signalweg überlappen. Typ I IFNs aktivieren die Transkriptionsfaktoren STAT2 und STAT1 über JAK1 und Tyrosin Kinase 2 (TYK2) (Bach et al., 1997; Prejean and Colamonici, 2000; Karaghiosoff et al., 2000; Varinou et al., 2003; Chen et al., 2004). Der ISGF3 Komplex transloziert in den Zellkern und initiiert die Transkription der Gene, die eine ISRE Sequenz in ihren Promotorregionen aufweisen. Im Gegensatz zu IFN- $\gamma$  benötigt die Aktivierung dieser Gene durch Typ I IFN keine *de novo* Proteinbiosynthese und gilt daher als primäre Antwort. Eine Assoziation von IRF-9 mit dem STAT1 Homodimer (GAF) kann die Spezifität des Transkriptionsfaktors von GAS- auf ISRE-Promotoren umlenken (Bluyssen et al., 1995). Im Gegenzug können Typ I IFNs die Formierung von GAF initiieren und damit über GAS-Elemente die Genexpression induzieren (Platanias, 2005). Somit kann die transkriptionelle Spezifität von IFN- $\gamma$  auf der Ebene der sekundären Responsivität modifiziert und damit typische Typ I responsive Gene aktiviert werden (Gao et al., 1993).

Durch die Stimulation von Zellen mit IFN- $\gamma$  wird die Transkription von über 2000 Genen aktiviert (Boehm et al., 1997; Taylor et al., 2004; Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2009), deren Genprodukte mannigfaltige und essentielle zelluläre Effekte sowohl auf die angeborene als auch auf die adaptive Immunität ausüben.

Einige Gene werden synergistisch durch IFN- $\gamma$  und das, überwiegend durch M $\Phi$  sekretierte, TNF- $\alpha$  induziert (Paludan, 2000; Degrandi et al., 2009). Der synergistische Effekt rührt von der Interaktion zwischen dem durch TNF- $\alpha$  aktivierten NF- $\kappa$ B und den IFN- $\gamma$  abhängig induzierten Transkriptionsfaktoren her. Die meisten von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induzierten Gene beinhalten sowohl eine ISRE als auch eine Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Promotorbindestelle. Außerdem wird durch TNF- $\alpha$  auch IRF-1 NF- $\kappa$ B abhängig induziert (Fujita et al., 1989). Andersherum spielt IFN- $\gamma$  bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine Rolle

(Siebenlist et al., 1994). Außerdem kann der TNF- $\alpha$  Rezeptor durch IFN- $\gamma$  induziert werden (Tannenbaum et al., 1993).

Wie bereits erwähnt, wird IFN- $\gamma$  von T<sub>H1</sub> Zellen produziert, wohingegen die T<sub>H2</sub> Zellen vor allem IL-4 und IL-5 sekretieren. Generell wird die T<sub>H1</sub> vermittelte zelluläre Immunität durch intrazelluläre Pathogene wie Bakterien und Protozoen induziert, während T<sub>H2</sub> assoziierte Immunantworten über Antikörper abhängige Effektormechanismen, wie z. B. in der Abwehr gegen Nematoden, vermittelt werden. IFN- $\gamma$  stimuliert damit die angeborene zellvermittelte Immunität, die spezifische zytotoxische Immunität über die Erkennung der MHC assoziierten Antigene und die Aktivierung von M $\Phi$ . In Infektionsexperimenten mit intrazellulären Pathogenen wie Leishmanien, Toxoplasmen und Listerien führt die Unterbindung der T<sub>H1</sub> Antwort, und im Einzelnen die Beeinflussung der IFN- $\gamma$  Produktion und Wirkung zur unvollständigen Beseitigung der Pathogene (Sher and Coffman, 1992; Reiner and Locksley, 1995).

IL-12 wird von aktivierten DCs, oder von durch Lipopolysaccharide (LPS) oder andere PAMP Moleküle induzierten Neutrophilen und M $\Phi$  sekretiert (Macatonia et al., 1995; Trinchieri, 1995; Heufler et al., 1996). IL-12 induziert die Genexpression (Lederer et al., 1996) und Sekretion (Trinchieri, 1995) von IFN- $\gamma$  in Antigen-stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen und auch in NK-Zellen und führt in Kombination mit IFN- $\gamma$  zur T<sub>H1</sub> Polarisation der T<sub>H</sub> Zellen (Wenner et al., 1996) und zur Aktivierung der NK-Zellen. Andersherum wird IL-12 durch IFN- $\gamma$  in M $\Phi$  und Monozyten induziert (Yoshida et al., 1994; Hayes et al., 1995). Die T<sub>H1</sub> Modalität wird somit durch einen positiven „feed-back-loop“ stabilisiert. Im Gegenzug werden durch IFN- $\gamma$  das Wachstum und die *in vitro* Differenzierung von T<sub>H2</sub> Zellen inhibiert (Seder et al., 1992).

IFN- $\gamma$  ist in den Klassenwechsel von IgM zu IgG2a der Antigen-sezernierenden B-Plasmazellen involviert (Collins and Dunnick, 1993). Die Wirkung von IFN- $\gamma$  ist IL-2 abhängig und korreliert mit der B-Zell Aktivierung über den B-Zell-Rezeptor (BCR) (Snapper et al., 1996). Das durch NK-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  kann eine wichtige Signalquelle für den Klassenwechsel der B-Zellen bei LPS Stimulation sein (Snapper et al., 1993). Außerdem wirkt IFN- $\gamma$  dem, durch IL-4 induzierten Klassenwechsel zu IgG1 und IgE durch die Konkurrenz von STAT1 mit den, durch IL-4 aktivierten, STAT6 Molekülen für die Bindung an gemeinsame GAS Elemente in Immunoglobulinen, entgegen (Schroder et al., 2004).

IFN- $\gamma$  unterstützt die Bekämpfung von Pathogenen über die Hochregulation der Expression von Fc $\gamma$ RI auf der Zelloberfläche von M $\Phi$ , wodurch die Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität gesteigert wird. Fc $\gamma$ RI bindet extrazelluläre Pathogene in der adaptiven Phase der Immunantwort, die durch IgG2a opsonisiert sind.

Die erhöhte MHC I vermittelte Antigenpräsentation ist ausschlaggebend für die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, insbesondere gegen Viren. Dadurch werden die Erkennung von Fremdpeptiden und die zytotoxische Aktivität von T-Zellen gesteigert. Die gesteigerte Expression der MHC Moleküle war einer der ersten beobachteten biologischen Effekte der Interferone (Chang et al., 1992). Außerdem regulieren Interferone die Expression von Genen, die für die MHC I vermittelte Antigenpräsentation essentiell sind (David-Watine et al., 1990; Singer and Maguire, 1990; Tataka and Zeff, 1993). MHC I Gene werden in fast allen Geweben exprimiert (Boehm et al., 1997). Bei der Hochregulation der MHC I Expression durch IFN- $\gamma$  spielt der Transkriptionsfaktor IRF-1 eine wichtige Rolle. IFN vermittelte Genexpression wird dabei vorwiegend durch die ISRE Elemente und den Verstärkerkomplex Enhancer A reguliert. Der Letztere verfügt über drei partiell überlappenden NF- $\kappa$ B Konsensussequenzen und einer AP-2 Bindestelle (Singer and Maguire, 1990). Mutation oder Verlust der ISRE oder der Enhancer A Sequenz in murinen oder humanen MHC I Promotoren heben den induzierenden Effekt von IFN- $\gamma$  auf (Israel et al., 1987). TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  wirken synergistisch auf die Induktion der MHC I Gene, weil sowohl NF- $\kappa$ B als auch IRF-1 für die Expression benötigt werden (Johnson and Pober, 1990).

Das Proteasom ist eine Endopeptidase mit einer multieinheitlichen Struktur, die für die Generierung der, mit Hilfe von MHC I Molekülen, auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide verantwortlich ist (York and Rock, 1996). Nach Induktion mit IFN- $\gamma$  wird das „Immunproteasom“ aktiviert, in welchem die konstitutiven  $\beta$ -Untereinheiten des „normalen“ Proteasoms durch LMP-2, LMP-7 und MECL-1 Untereinheiten ersetzt werden (Groettrup et al., 1996). Dadurch wird sowohl die proteolytische Aktivität des Proteasoms als auch die Quantität, Qualität und das Repertoire an Peptiden erhöht, welche auf MHC I Molekülen geladen werden, was wiederum zu erhöhter und effektiverer MHC I Antigenpräsentation beiträgt (Schroder et al., 2004).

Über den MHC II vermittelten Signalweg werden Peptide aus lysosomalen/endosomalen Kompartimenten an der Zelloberfläche präsentiert. Die bakteriellen oder parasitären Antigene in diesen Organellen werden auf diese Weise den CD4<sup>+</sup> T-Zellen zugänglich

gemacht, um eine adäquate adaptive Immunantwort gegen phagozytierte Pathogene zu initiieren. Der MHC II Signalweg ist nur auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, wie DCs, B-Zellen und M $\Phi$  konstitutiv aktiv. Neben dem MHC I Signalweg reguliert IFN- $\gamma$  auch die Expression von Genen, die in die MHC II Antigenpräsentation involviert sind und fördert dadurch die peptidspezifische Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Alle Schlüsselgene, die im MHC II Signalweg beteiligt sind, wie die MHC II transmembranen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, die invariante Kette (Ii), und die DMA- und DMB-Ketten werden mittels des, durch IFN- $\gamma$  induzierbaren, Transkriptionsfaktors CIITA reguliert (Cresswell, 1994; Wolf and Ploegh, 1995; Chang and Flavell, 1995; Mach et al., 1996).

Mehrere lysosomale Proteasen sind an der Generierung der MHC II-spezifischen Peptide beteiligt. Drei davon, Cathepsin B, H und L werden durch IFN- $\gamma$  in M $\Phi$  induziert (Lah et al., 1995; Lafuse et al., 1995b).

T<sub>H</sub>1 Zellen können M $\Phi$  über IFN- $\gamma$  aktivieren, woraufhin M $\Phi$  eine erhöhte mikrobizide Kapazität gegenüber vielen intrazellulären und phagozytierten Organismen aufbauen. Die Aktivierung führt zur Freisetzung von zwei Arten von toxischen Effektormolekülen, reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffintermediaten (RNI, ROI). Die ROI stellen Zwischenschritte bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser dar. Die Freisetzung von ROI wird auch als respiratorischer oder oxidativer Burst bezeichnet. Die Reaktionsreihe wird durch den membranassoziierten Enzymkomplex Phagozyten Oxidase (Phox) eingeleitet, der NADPH-abhängig das Superoxid oder Hyperoxidanion O<sub>2</sub><sup>-</sup> als ein Vorläufermolekül der ROI erzeugt. Phox ist ein Multikomponenten-Enzym, welches das Flavocytochrom als Ko-Faktor enthält. Der Komplex besteht aus vier Komponenten. Zwei davon, die Untereinheiten gp91<sup>phox</sup> und gp22<sup>phox</sup>, sind mit der Membran von Phagosomen assoziiert und die beiden anderen, gp47<sup>phox</sup> und gp67<sup>phox</sup> sind zytosolisch. Die Expression von gp91<sup>phox</sup> und gp67<sup>phox</sup> wird IFN- $\gamma$  abhängig induziert (Gupta et al., 1992). Nach Stimulation translozieren die Untereinheiten aus dem Zytosol zur Plasmamembran und bilden einen aktiven Komplex, der die Ein-Elektron-Reduktion von O<sub>2</sub> im Phagosom katalysiert (Kim et al., 2011). Aus Superoxid entsteht durch die Katalyse mit der Superoxid-Dismutase Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), welches sich zu hochreaktiven Hydroxylradikalen  $\cdot$ OH oder dem Oxidationsmittel hypochlorige Säure (HOCl) katalytisch zersetzen kann (MacMicking et al., 1997). Infektionen mit *Salmonella typhimurium* und *Staphylococcus aureus* können durch gp47<sup>phox</sup> oder gp91<sup>phox</sup> defiziente Mäuse nicht kontrolliert werden (Nathan, 1997).

Mit RNI bezeichnet man verschiedene Oxidationsstufen von Stickstoffprodukten, welche durch die katalytische Wirkung der Stickstoffmonoxid-Synthasen (eNOS, nNOS, iNOS) entstehen (Nathan and Shiloh, 2000). iNOS wird IRF-1 abhängig durch IFN- $\gamma$  induziert (Kimura et al., 1994; Briken et al., 1995). Die RNI Produktion erhöht die Fähigkeit von phagozytierenden Zellen die aufgenommenen Pathogene durch eine effiziente Fusion der Phagosomen mit Lysosomen zu töten. Mäuse mit einem deletierten iNOS Gen zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *Leishmania major* und eine reduzierte, unspezifische inflammatorische Immunantwort (Wei et al., 1995). Das RNI Stickstoffmonoxid NO $\cdot$  ist ein instabiles Gasradikal und ist das kleinste biosynthetische Sekretionsprodukt der Zellen von Säugetieren. Es entsteht als Nebenprodukt bei der iNOS katalysierten, NADPH-abhängigen, Reduktion von L-Arginin zu L-Citrullin. Als intrazellulärer Botenstoff spielt es eine Rolle bei vielen zellulären Prozessen, unter anderem bei Vasodilatation, Neurotransmission sowie bei der anti-mikrobiellen und antiviralen Resistenz (Nathan, 1992). iNOS ist essentiell für die Abwehr gegen *Mycobacterium tuberculosis* und *Leishmania major* (Bogdan et al., 2000). Die Regulation der NO $\cdot$  Produktion in M $\Phi$  durch IFN- $\gamma$  korreliert mit der transkriptionellen Ko-Induktion von Tetrahydrobiopterin (BH $_4$ ) und GTP-Cyclohydroxylase-I, die an der enzymatischen Reaktion beteiligt sind (Baek et al., 1993). Die L-Arginin-Synthase ist ebenfalls IFN- $\gamma$  induzierbar (Morris, Jr. and Billiar, 1994). Die Interaktion von toxischen Sauerstoffintermediaten mit den, durch iNOS produzierten, Stickstoffzwischenprodukten kann zur Bildung toxischer und hochreaktiver Substanzen (z.B. Peroxynitrit) führen (MacMicking et al., 1997), die die Nukleinsäuren angreifen und an der Zerstörung einer Vielzahl chemischer Verbindungen beteiligt sind. Generell gilt, dass ROI für die Abwehr phagozytierter extrazellulärer Pathogene verantwortlich sind oder Pathogene töten, die zu groß sind um sie zu phagozytieren (z. B. Würmer), während RNI intrazelluläre Mikroorganismen abtöten. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität führen ROI und RNI allerdings auch zu lokaler Zerstörung von Geweben, weswegen ihre Aktivität erst im Rahmen einer Immunantwort freigesetzt wird und nicht konstitutiv wirkt (Nathan and Shiloh, 2000).

Durch IFN- $\gamma$  wird außerdem das membranintegrierte Protein Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1 (NRAMP1) induziert, welches in manchen Mäusestämmen die Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene wie Mykobakterien, Salmonellen und Leishmanien vermittelt (Vidal et al., 1995).



Die antivirale Aktivität von IFN- $\alpha/\beta$  und  $-\gamma$  beruht auf zum Teil redundanten Mechanismen, um unterschiedliche Viren auf allen Stufen ihrer Replikation zu bekämpfen. Besonders gut charakterisierte IFN induzierte antivirale Proteine sind die Mx Proteine, die dsRNS-abhängige Protein Kinase R (PKR), die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (2-5OAS) und die doppelsträngige RNS (dsRNS) Adenosin Desaminase (dsRAD) (Boehm et al., 1997). Die Mx Proteine werden später ausführlich im Zusammenhang mit den Guanylat-bindenden Proteinen (GBPs) und anderen GTP-bindenden Proteinen behandelt (siehe 1.3.2). Die PKR ist eine Serin/Threonin Kinase, die durch die dsRNS von Viren aktiviert wird, woraufhin sie die  $\alpha$ -Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF-2 phosphoryliert. Dadurch wird die virale Proteinbiosynthese inhibiert (Meurs et al., 1990). Die Überexpression von PKR führt zur replikativen Inhibition von Encephalomyocarditis (ECMV) und Vaccinia Viren sowie zur Etablierung eines antiviralen Zustandes (Meurs et al., 1992; Lee and Esteban, 1993). Die 2-5OAS Aktivität führt zur RNaseL abhängigen Degradation von einzelsträngiger viraler RNS (ssRNS) und zur Inhibition der viralen Proteinbiosynthese (Graham et al., 1993; Greenlund et al., 1993). dsRAD katalysiert die Desaminierung von Adenosin, wobei die dsRNS als Substrat dient. Die Aktivität führt zur Entstehung einer sogenannten „editierten“ RNS, die zu keinem funktionalen Protein translatiert werden kann (Bass et al., 1989).

Ein weiteres IFN- $\gamma$  induzierbares Gen ist die Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), die in den Metabolismus von Tryptophan involviert ist. IDO reguliert über die Tryptophan Depletion das Wachstum von Parasiten wie *Toxoplasma gondii* und *Chlamydia psittaci*, wie auch von weiteren Bakterien und Viren (Pfefferkorn, 1984; Gupta et al., 1994; Daubener et al., 1996; Daubener et al., 1999).

Die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen (EZ) spielen in der Biologie des Immunsystems eine zentrale Rolle und werden maßgeblich von IFN- $\gamma$  reguliert, indem das Zytokin die Expression der Adhäsionsmoleküle, wie Selectine, während der Lymphozytenaktivierung induziert (Rossiter et al., 1994; Baggiolini et al., 1994; Bradley and Watson, 1996). Vor allem aber spielen von vielen Zellen nach IFN- $\gamma$  sekretierte Chemokine, wie MIP-1 $\alpha$ , RANTES und MCP-1 für die zellulären Interaktionen eine wichtige Rolle (Taub et al., 1993; Tanaka et al., 1993). Aber auch die Integrinliganden ICAM-1 und VCAM-1 werden auf Endothelzellen durch IFN- $\gamma$  induziert (Pober and Cotran, 1990).

IFN- $\gamma$  ist außerdem für die Hochregulation von Bestandteilen des Komplementsystems (Kimura et al., 1994; Boehm et al., 1997), sowie von p47 und p65 GTPasen verantwortlich (Briken et al., 1995; Degrandi et al., 2007). Letztere werden IRF-1 abhängig induziert und werden in folgenden Abschnitten ausführlich behandelt (siehe 1.3.3 und 1.3.4).

Durch IFN- $\gamma$  wird die Ausbildung von Autophagosomen induziert. Diese fusionieren mit Lysosomen, an welche sie die Fracht aus zytoplasmatischen ubiquitinierten Proteinen und Organellen für Degradation und Recycling liefern (Kroemer and Levine, 2008). Kürzlich wurde gezeigt, dass Proteine, die in die Autophagie involviert sind, eine Rolle in der Kontrolle von intrazellulären bakteriellen und parasitären Infektionen spielen (Zhao et al., 2008). So wird Atg5, das bei der Umsetzung von LC3 I zu LC3 II und dessen Assoziation mit den Autophagosomen essentiell ist (Mizushima et al., 2002), für die *in vivo* Resistenz gegen Listerien und Toxoplasmen in M $\Phi$  benötigt (Zhao et al., 2008). Bei *T. gondii* ist es an der Zerstörung der parasitophoren Vakuole und Eliminierung des Parasiten durch die Rekrutierung der p47 GTPase Irga6 in einem Autophagosom-unabhängigen Prozess beteiligt (Halonen et al., 2001; Butcher et al., 2005; Ling et al., 2006; Taylor, 2007).

## 1.2 GTP-bindende Proteine

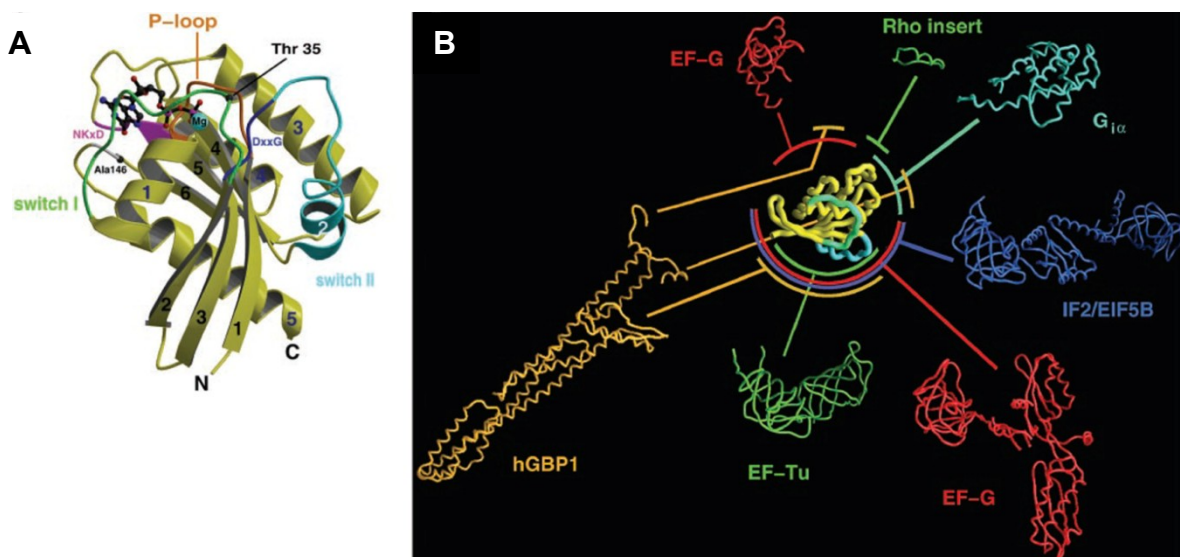
Manche der am stärksten durch IFN- $\gamma$  induzierten Gene kodieren für GTP-bindende Proteine oder für Proteine, die mit GTP-bindenden Proteinen interagieren (Martens and Howard, 2006; Degrandi et al., 2007).

GTP-bindende Proteine regulieren zahlreiche fundamentale zelluläre Prozesse, wie die intrazelluläre Signaltransduktion (kleine Ras verwandte Proteine, heterotrimeren G-Proteine), die Proteinbiosynthese (Elongations- und Initiationsfaktoren), die Organisation des Zytoskeletts und den vesikulären Transport (Rab/Ypt1), die Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung der Zelle (p21Ras, Dynamin-verwandte Proteine) und die Rezeptor-vermittelte Endozytose (Dynamine) (Bourne et al., 1990). Basierend auf Sequenzhomologien lassen sich die GTP-bindenden Proteine in fünf Superfamilien einteilen: die  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine ( $G\alpha$ ), die Ras homologen kleinen GTPasen (Ras, Rho, Ran, Rab, Arf, etc.), die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3, etc.), das Signalerkennungspartikel und dessen Rezeptor (SRP54, Ffh, SR, FtsY, etc.) und die Dynamin-verwandten großen GTP-

bindenden Proteine (z.B. Dynamine, p47 und p65 GTPasen, Mx, „very large inducible GTPase“ (VLIG), Atlantine etc.). Physiologisch agieren die GTPasen als molekulare Schalter. Mechanistisch ist den GTPasen die  $Mg^{2+}$ -abhängige Bindung von GTP und die anschließende Hydrolyse zu GDP und/oder GMP gemein, die durch fünf konservierte Sequenzmotive G1-G5 vermittelt wird (Bourne et al., 1990; Bourne et al., 1991; Bourne, 1995), wobei die Motive G1 (GX4GK[S/T]), G3 (DXXG) und G4 (N[T/Q]KXD) in allen GTPasen konserviert sind. Das erste Motiv G1, welches auch P-Schleife oder Walker A Motiv genannt wird (Walker et al., 1982; Saraste et al., 1990; Via et al., 2000), interagiert mit den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatgruppen des Nukleotids über mehrere Kontakte zu Amidwasserstoffen der Hauptkette sowie der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins. Die Hydroxylgruppe des Serins oder Threonins der P-Schleife und eines weiteren Threonins in der Schalter I (Switch I) Region des zweiten Motivs sind in der GDP- und GTP-gebundenen Form an der Koordination des  $Mg^{2+}$ -Ions beteiligt. Das letztere Threonin und das konservierte Glycin aus dem G3 Motiv, das in der Switch II Region liegt, kontaktieren außerdem noch das  $\gamma$ -Phosphat von GTP. In den meisten GTP-bindenden Proteinen wie  $G\alpha$ , Ras, Translationsfaktoren und den Signalerkennungspartikeln folgt auf das Glycin ein Glutamin oder ein anderer hydrophiler Rest. Eine Mutation dieses Restes zu einem hydrophoben Rest verringert die GTPase-Aktivität über die Veränderung des  $pK_s$  Werts des  $\gamma$ -Phosphats und die Inhibition der durch GTPase aktivierenden Proteine (GAP) katalysierten Reaktion erheblich, was zur Entstehung von konstitutiv aktiven Proteinen mit onkogenen Eigenschaften führen kann (Boguski and McCormick, 1993; Schweins et al., 1995). Das G4 Motiv enthält die Sequenz für eine spezifische Erkennung der Guaninbase. Bei der Bindung stabilisiert die Asparaginsäure das Guanin der Base über zwei Wasserstoffbrücken, während zwei weitere konservierte Aminosäuren durch Kontakte zur P-Schleife die Struktur der Nukleotidbindungsstelle aufrechterhalten. Zusätzlich interagiert das Sauerstoffatom der Guaninbase mit dem invarianten Alanin über eine weitere Wasserstoffbrücke. Auf diese Weise wird aus sterischen Gründen die Bindung der Aminogruppe von Adenin nicht toleriert. Bei Ras Proteinen befindet sich die Guaninerkennungssequenz im G5 Motiv (Hilgenfeld, 1995). Weiterhin tragen viele Mitglieder verschiedener GTPase-Familien posttranslationale Modifikationen an ihren Carboxy- (C) Termini, an denen sie farnesyliert, geranylgeranyliert oder palmitoyliert werden können. Die kleinen Arf GTPasen zeichnen sich durch einen Amino- (N) terminalen Glycinrest aus, der myristoyliert wird (Moss and Vaughan, 1995). Die Geranylgeranyltransferase II erkennt die C-terminalen Sequenzen der Rab Proteine. Einige p47 GTPasen werden N-terminal myristoyliert und Mitglieder der p65 GTPasen

Familie werden aufgrund einer C-terminalen CaaX-Signalsequenz entweder farnesyliert oder mittels Geranylgeranyltransferase I geranylgeranyliert (Stickney and Buss, 2000; Fres et al., 2010). Die kovalent verknüpfte Isopreneinheit reguliert die subzelluläre Lokalisation der Proteine (Vestal et al., 2000).

Der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von verschiedenen GTP-bindenden Proteinen untereinander zeigt große Ähnlichkeit für die GTPase- (G) Domäne auf (Vetter and Wittinghofer, 2001 und siehe Abb. 1.2). Die minimale Grundstruktur der G-Domäne ist in Ras Proteinen gegeben (166 Aminosäuren, Vetter and Wittinghofer, 2001). Sie besteht aus einem sechssträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das von fünf  $\alpha$ -Helices umgeben ist (Pai et al., 1989). Diese Topologie wird bei den Strukturen von anderen GTP-bindenden Proteinen durch Additionen und Insertionen von weiteren Strukturelementen variiert (Abb. 1.2 B).

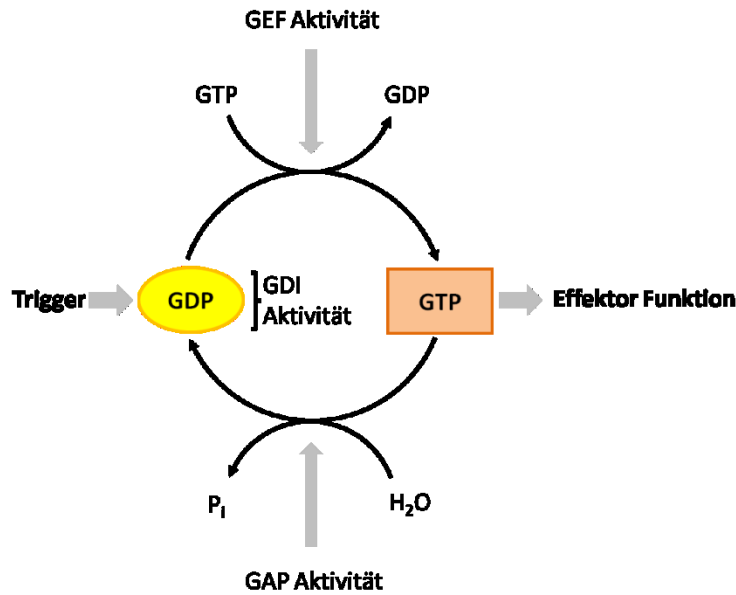


**Abb. 1.2: Strukturen von Guanylat-bindenden Proteinen.**

Bündelstruktur der minimalen G-Domäne mit konservierten Sequenzelementen und Switch Regionen. Das Nukleotid und das  $Mg^{2+}$ -Ion sind in der „ball-and-stick“ Form gezeigt (A). Additive Domänen in anderen Guanylat-bindenden Proteinen und ihre relative Position zur G-Domäne sind dargestellt (B). Aus (Vetter and Wittinghofer, 2001).

Die biologische Aktivität der GTP-bindenden Proteine wird innerhalb des Zyklus aus inaktivem GDP-gebundenen und aktivem GTP-gebundenen Zustand reguliert. In GTP-gebundener Form nimmt das Protein die Konformation ein, die die Interaktionen mit seinen Effektoren ermöglicht. Viele GTP-bindenden Proteine besitzen eine niedrige intrinsische GTPase-Aktivität, die durch GAP Proteine bis zu  $10^5$ -fach erhöht werden kann (Boguski and McCormick, 1993). Die GAPs wirken als Negativregulatoren und beenden die Signalweiterleitung, indem sie die Hydrolyse von GTP zu GDP stimulieren,

wobei das Protein deaktiviert wird und nicht mehr mit seinen Effektorproteinen interagieren kann (Zhang et al., 1993; Geyer et al., 1996). Die GAPs stellen den GTPasen *in trans* ein Arginin zur Verfügung, welches die negative Ladung während des Übergangszustandes stabilisiert („Arginin-Finger-Hypothese“) (Mittal et al., 1996; Ahmadian et al., 1997; Scheffzek et al., 1997). Eine ähnliche Rolle für den intrinsischen „Arginin-Finger“ ist auch bei heterotrimeren G-Proteinen bekannt und für das humane GBP1 (hGBP1) beschrieben (Coleman et al., 1994; Praefcke et al., 2004). Die Mutation dieser Aminosäure führt zu einer bis zu 1000-fach erniedrigten GTPase-Aktivität (Ahmadian et al., 1997; Bourne, 1997; Praefcke et al., 2004). Zusätzlich schilden die GAPs das aktive Zentrum vom Außenmedium ab und können den  $pK_s$  Wert des  $\gamma$ -Phosphat verändern, wodurch die Katalyse beschleunigt wird. Durch den Austausch von GDP gegen GTP erlangt das Protein wieder seine aktive Konformation. Der Nukleotidaustausch wird häufig durch guanine nucleotide exchange factors (GEFs) katalysiert, die die Dissoziation von GDP von der GTPase über den Kontakt zu den Switch Regionen beschleunigen (Ahmadian et al., 1997; Praefcke et al., 2004). Einige Proteine, z. B. Effektoren von Ras, Rab und Rho regulieren den GTPase-Zyklus, indem sie an die GTPase-GDP Form binden und die Dissoziation der Nukleotide verlangsamen. Sie werden als Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) bezeichnet (Abb. 1.3). Die Voraussetzung für die Bindung von GDIs ist die Prenylierung des C-Terminuses der GTPase. GDIs schirmen den hydrophoben Lipidschwanz von der wässrigen Lösung ab und bewahren damit den zytoplasmatischen Pool an prenylierten Proteinen, was den Rab und Rho Proteinen den Transport zwischen verschiedenen membranumgebenen Kompartimenten der Zelle ermöglicht. Die GTPase-Reaktion von Ras ist von medizinischer Relevanz, denn 25-30% menschlicher Tumoren werden auf Punktmutationen in Ras oder RasGAP Proteinen zurückgeführt, welche durch Defekte in der Hydrolyse zum unkontrollierten Zellwachstum führen können (Ahmadian et al., 1997).

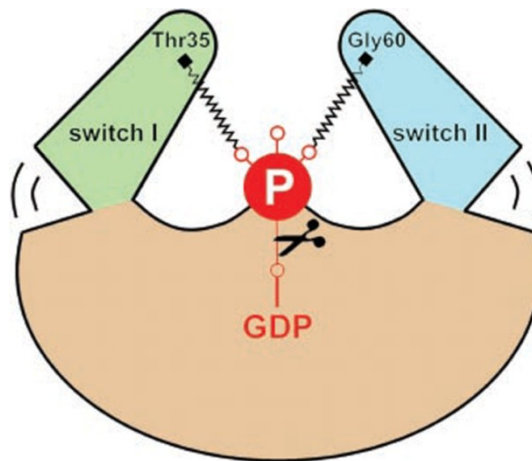


**Abb. 1.3: GTPase-Zyklus von GTP-bindenden Proteinen.**

Der Austausch des gebundenen GDP zu GTP überführt das GTP-bindende Protein in seinen aktiven Zustand. Dieser Vorgang wird durch GEFs beschleunigt. Das aktive, GTP-gebundene Protein kann an seine Effektorproteine binden. Manche von ihnen verlangsamen die Dissoziation der Nukleotide und nehmen so als GDIs Einfluss auf den GTPase-Zyklus. Die Inaktivierung erfolgt durch die Hydrolyse von GTP zu GDP und/oder GMP (nicht dargestellt) und Phosphat ( $P_i$ ), die durch GAPs beschleunigt werden kann. Aus (Martens and Howard, 2006).

Der Mechanismus der molekularen Schaltung vom GTP- zum GDP-gebundenen Zustand wird über die Aktivierung des Wassernukleophils induziert, welches das GTP hydrolysiert. Dabei tritt GTP selbst als katalytische Base auf. Man spricht von Substrat-assoziiertes Katalyse. Für den nukleophilen Angriff wird das Wassermolekül im Falle der p21Ras GTPase zwischen Q61 und dem  $\gamma$ -Phosphat von GTP positioniert. Dieses Glutamin ist innerhalb der Ras-Superfamilie und den  $G\alpha$ -Proteinen stark konserviert und ist sowohl an der intrinsischen Katalysereaktion über die Stabilisierung des Übergangszustandes, als auch an der GAP-stimulierten GTPase-Reaktion beteiligt. Mechanistisch bildet das Glutamin eine Wasserstoffbrückenbindung zum Nukleophil  $\text{OH}^-$  und eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zum planaren Phosphatsauerstoff aus (Prive et al., 1992; Scheffzek et al., 1997).

Die induzierten Konformationsänderungen können am besten mit einer unter Spannung gesetzten Feder beschrieben werden, wobei die Freisetzung des  $\gamma$ -Phosphats nach GTP-Hydrolyse zur Relaxation der beiden Switch Regionen und der GDP-spezifischen Konformation führt (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung des universalen Switch Mechanismus.**

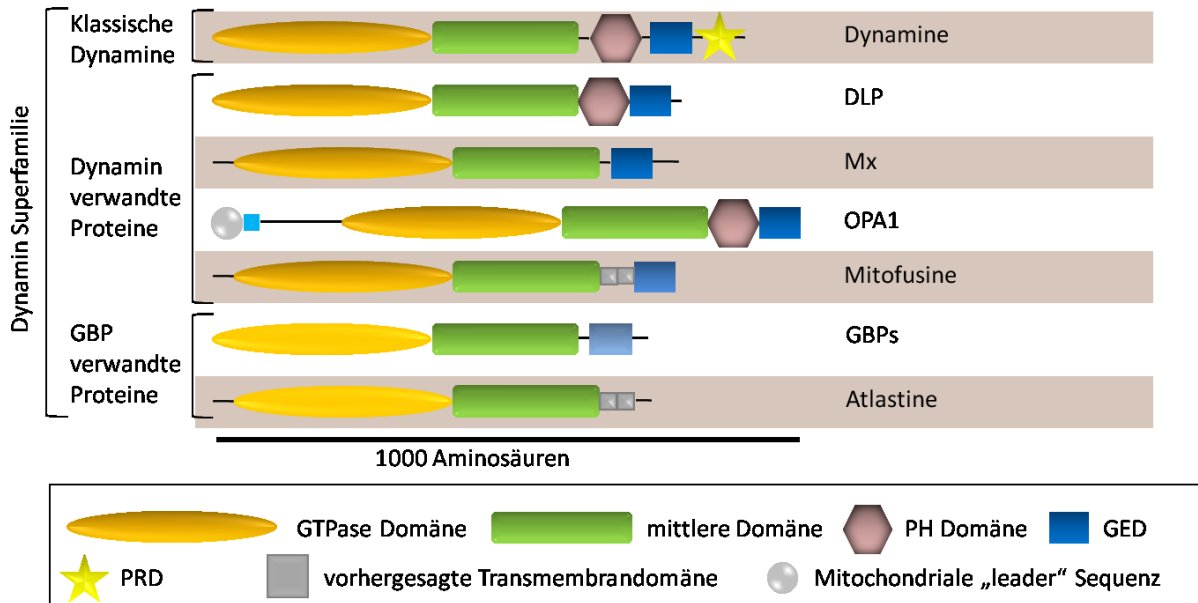
Die Switch I und II Regionen binden an das  $\gamma$ -Phosphat von GTP über die NH-Gruppen der invarianten T und G Aminosäuren, was als Mechanismus der angezogenen Feder bezeichnet werden kann. Die Freisetzung des  $\gamma$ -Phosphats nach der GTP-Hydrolyse führt zur Konformationsänderungen in den Switch Regionen. Aus (Vetter and Wittinghofer, 2001).

### 1.3 Die Dynamin-Familie der großen GTP-bindenden Proteine

Zur Dynamin-Familie der großen GTP-bindenden Proteine in eukaryotischen Zellen zählen aufgrund der Ähnlichkeit in Struktur und biochemischen Eigenschaften klassische Dynamine, Dynamin-verwandte Proteine, darunter OPA1, Mx Proteine, Mitofusine, die Familien der p47 und p65 Guanylat-bindenden Proteine und Atlantine (Praefcke and McMahon, 2004 und siehe Abb. 1.5). Die biologischen Funktionen dieser Proteine betreffen die Regulation der Membranfusion, Abschnürung von Transportvesikeln und Teilung von Organellen. Zudem wird ihrer Funktion in der Abwehr von viralen, parasitären und bakteriellen Pathogenen immer mehr Bedeutung beigemessen.

Das Molekulargewicht der Proteine dieser Familien erstreckt sich zwischen 60 und 100 kDa. Biochemisch zeichnen sie sich im Vergleich zu Ras GTPasen durch niedrige Nukleotidaffinität ( $\mu\text{M}$  Bereich), hohe Hydrolyseraten und die Fähigkeit die GTPase-Aktivität durch nukleotidabhängige Oligomerisierung zu stimulieren aus. Die Kooperativität der GTPase-Aktivität versetzt sie in die Lage, den GTPase-Zyklus ohne die extrinsische Regulation durch GAPs und GEFs zu durchlaufen. Der Status der Nukleotidbindung und damit die Funktion, werden stattdessen, wie im Falle der p47 GTPasen, durch Mitglieder der eigenen Proteinfamilie reguliert (Hunn et al., 2011). Viele Mitglieder können mit Lipidmembranen interagieren. Neben der Funktion als molekulare Schalter können Dynamine und Dynamin-verwandte Proteine als chemomechanische

Enzyme physikalische Arbeit leisten (Song and Schmid, 2003). In Abbildung 1.5 ist die Domänenstruktur einiger Mitglieder der Dynamin-Familie der großen GTP-bindenden Proteine gezeigt, auf die im Weiteren näher eingegangen wird.



**Abb. 1.5: Domänenstruktur von Mitgliedern der Dynamin-Familie der großen GTP-bindenden Proteine.**

Alle Mitglieder enthalten eine GTPase-, eine Mittel- und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Echte Dynamine haben zwischen der Mitteldomäne und der GED-Domäne eine Pleckstrin Homology (PH)-Domäne und am C-Terminus eine Prolin- und Arginin-reiche Domäne (PRD). Andere Mitglieder verfügen über abweichende Segmente. Aus (Praefcke and McMahon, 2004).

### 1.3.1 Dynamine

Ursprünglich wurde Dynamine aus dem Gehirn von Ratten als eine Mikrotubuli bindende GTPase und als Substrat für die Protein Kinase C (PKC) in Nervenzellen identifiziert (Shpetner and Vallee, 1989; Obar et al., 1990; Robinson, 1991; Chen et al., 1991; Cao et al., 1998). Dynamine spielen eine entscheidende Rolle bei Prozessen der Vesikelabschnürung und Organellteilung, darunter bei der Ausbildung von Clathrin umhüllten Vesikeln und Caveolae, bei der Entstehung von Phagosomen, während der Reorganisation von Aktin und bei der Zytokinese (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998; Gold et al., 1999; van Dam and Stoorvogel, 2002; Orth and McNiven, 2003).

Alle Dynamine weisen eine etwa 300 Aminosäuren große N-terminale G-Domäne mit den konservierten GTP-Bindungsmotiven (G1-G4) auf (Niemann et al., 2001), die von einer etwa 150 Aminosäuren großen Mitteldomäne, auch „Assembly“-Domäne genannt,



einer Pleckstrin Homology-Domäne (PH) und einer GTPase-Effektor Domäne (GED), sowie einer prolinreichen Domäne (PRD) gefolgt werden. Es bestehen intramolekulare Wechselwirkungen zwischen der Mitteldomäne und der GED-Domäne, die in den Oligomerisierungsprozess involviert sind (Muhlberg et al., 1997; Smirnova et al., 1999). Dabei interagiert die C-terminale  $\alpha$ -Helix mit der hydrophoben  $\alpha$ -helikalen Vertiefung, die die G-Domäne flankiert. Es entsteht ein dreihelikales Bündel, welches auch als „Bündelsignalelement“ bezeichnet wird. Dieses übermittelt Signale zwischen der G-Domäne und den beiden C-terminalen Domänen (Chappie et al., 2009; Chappie et al., 2010). Essentiell für die Endozytose ist die Interaktion der Dynamine über die PH-Domäne mit Phospholipiden von Membranen, hauptsächlich mit Phosphoinositol(4,5)P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) (Zheng et al., 1996; Salim et al., 1996; Klein et al., 1998; Vallis et al., 1999; Lee et al., 1999). Die GED-Domäne von Dynaminen fungiert als molekulares GAP über Kontakte mit der Mitteldomäne, der G-Domäne und mit sich selbst (Muhlberg et al., 1997; Smirnova et al., 1999; Okamoto et al., 1999; Zhang and Hinshaw, 2001). Die Wechselwirkung führt zu einer kooperativen Erhöhung der GTPase-Aktivität (Sever et al., 1999). Die PRD-Domäne enthält Bindungsstellen für eine Vielzahl von Src-Homology-3 (SH3)-Domänen (Shpetner and Vallee, 1989; Gout et al., 1993; Herskovits et al., 1993b; Seedorf et al., 1994; Shpetner et al., 1996; David et al., 1996; Ringstad et al., 1997; Rasmussen et al., 1998), über welche die Dynamine zu den Clathrin umhüllten Vesikeln der Plasmamembran rekrutiert werden (Shupliakov et al., 1997). Die GTPase-Aktivität von Dynamin wird *in trans* durch die nukleotidabhängige Oligomerisierung erhöht (Tuma and Collins, 1994; Warnock et al., 1996). Die Spaltung von GTP zu GDP ist der limitierende Schritt für die Hydrolyserate und ist wie bei den Ras GTPasen irreversibel (Binns et al., 2000). Mutationen in der G-Domäne der Dynamine, insbesondere die Mutation des konservierten Lysins oder Serins in der P-Schleife führen zu einer homogenen Verteilung von Dynamin an Clathrin-reichen Stellen der Membran, woraus eine Inhibition der Endozytose resultiert. Im nukleotidfreien Zustand und unter physiologischen Salzkonzentrationen liegt Dynamin als Gleichgewicht aus Mono- und Tetrameren vor (Binns et al., 1999; Binns et al., 2000). Zunächst bilden die G-Domäne und die GED-Domäne ein sogenanntes „Bündelsignalelement“ (BSE), welches die Funktion von Dynamin *in vitro* und *in vivo* modulieren kann (Chappie et al., 2009). Diese *in trans* Interaktion führt zur Ausbildung eines stabilen Dimers, das im Folgenden über die Wechselwirkung der GED-Domäne und der mittleren Domäne zu einem Tetramer assembliert. Dynamine weisen eine niedrige Affinität zu GTP (0,2–1  $\mu$ M zu mant-dGTP

(2'/3'-O-(N'-Methyl-anthraniloyl)-GTP)) und eine noch niedrigere zu GDP (19  $\mu\text{M}$  zu mant-GDP) auf (Praefcke and McMahon, 2004). Die Bindung von GTP erfolgt nach einem Zwei-Schritte-Mechanismus (Binns et al., 2000). Unter physiologischen Bedingungen liegt das Protein konstitutiv GTP-gebunden vor (Krishnan et al., 2001). Es wird postuliert, dass die GTP-gebundene Form von Dynamin die biologisch aktive ist, so können die Dynamine durch die Bindung von nicht-hydrolysierbarem GTP Analogon GTP $\gamma$ S oder Aluminiumfluorid zur Membran rekrutieren und oligomerisieren. Die starke Bindung an Membranen wird durch die Avidität der oligomerisierten Proteine zu Phosphatidylinositolphosphaten (PIP<sub>2</sub>) über die PH-Domänen vermittelt (Tuma and Collins, 1995; Vallis et al., 1999; Lee et al., 1999). Mechanistisch wurde vorgeschlagen, dass die Ausbildung eines Dynamin-Oktamers über die G-Domänen im Übergangszustand durch die Dimerisierung zweier Tetramere vermittelt wird. Da jedes Tetramer vier unabhängige G-Domänen hat, können sie sich zu gestaffelten Ringen und Spiralen an den Hälsen der Clathrin umhüllten Vesikel zusammenlagern (Chappie et al., 2010). Dabei wird die GTPase-Aktivität aller Dynaminmoleküle kooperativ stimuliert. Durch die Konformationsänderungen der Proteine, die durch die GTP-Hydrolyse oder mit Hilfe von weiteren Effektormolekülen, wie Endophilin oder Synaptojanin initiiert werden, wird das Vesikel von der Membran abgelöst (Shpetner and Vallee, 1992; Tuma and Collins, 1994; Hinshaw and Schmid, 1995; Warnock et al., 1996; Takei et al., 1996; Ringstad et al., 1997; Sweitzer and Hinshaw, 1998; Stowell et al., 1999; Sever et al., 1999). Paradoxerweise akkumulieren sich Hinweise, dass die stimulierte GTPase-Aktivität die Disassemblierung der Dynaminstrukturen vermittelt und in der Dissoziation von Dynamin von der Membran resultiert (Ramachandran and Schmid, 2008). Der Zyklus aus GTP-Bindung, G-Domänendimerisierung, GTP-Hydrolyse und Disassemblierung dient möglicherweise zur Ausbildung eines Dynaminpolymers mit einer kritischen Größe, die die Vesikelabschnürung katalysieren kann. Alternativ könnten durch die G-Domänendimerisierung Spannungen an der Membran ausgelöst werden, die die Membranablösung vorantreiben (Praefcke and McMahon, 2004).

Die Mutation des katalytischen Arginins in der GED-Domäne blockiert die Abschnürung des Vesikels, wodurch die Hypothese der Funktion von Dynaminen als molekulare Schalter unterstrichen wird (Scheffzek et al., 1997; Sever et al., 1999). Ein weiterer Phänotyp tritt bei GTPase-Mutanten, die die Hydrolyseaktivität verlangsamen auf. Unter diesen Bedingungen kommt es nicht zu einer Vesikelabtrennung, stattdessen werden die Membranhäse der abzuschnürenden Vesikel verlängert und es kommt zur

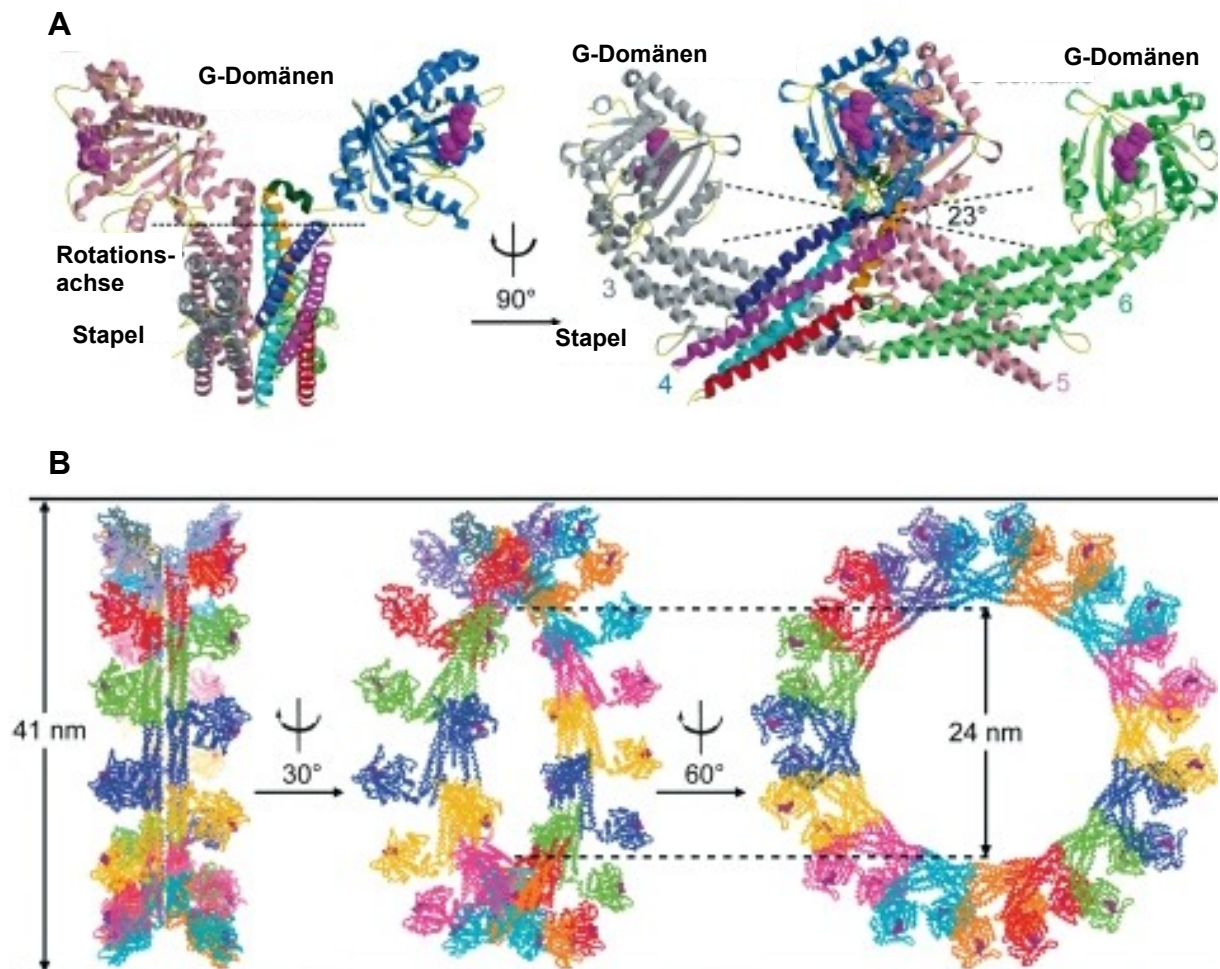
Lipidubulation. Diese, an endozytotischen Markern reichen Tubuli, fusionieren und durchziehen am Ende die ganze Zelle (Marks et al., 2001). In einem dritten Modell wird vorgeschlagen, dass die Dynamine die Membran durch Integration und Veränderung der Oberflächenspannung direkt destabilisieren (Burger et al., 2000). Nach Vesikelabschnürung verbleibt das Dynamin am Ort der Abtrennung am Vesikel und kann an diesem Punkt über die PRD-Domäne eine Interaktionsfläche für weitere Dynamin-bindende Proteine bieten, die z. B. die Assemblierung von polarisiertem Aktin induzieren (Lee and de Camilli, 2002; Orth and McNiven, 2003).

### 1.3.2 Mx-Proteine

Das *Mx* Gen (Myxovirus Resistenzgen) wurde im A2G Mäusestamm im Zusammenhang mit erhöhter Resistenz gegenüber Inflenzaviren entdeckt (Lindenmann, 1962; Lindenmann, 1964). Das *Mx1* Gen wurde 1986 kloniert (Staehele et al., 1986). Homologe existieren in Säugern, Vögeln und Fischen (Staehele and Haller, 1985; Meier et al., 1988; Aebi et al., 1989; Staehele et al., 1989; Horisberger and Gunst, 1991; Muller et al., 1992; Charleston and Stewart, 1993; Bernasconi et al., 1995). Sie sind bis heute die bekanntesten zellautonomen Resistenzfaktoren und zeigen den stärksten antiviralen Effekt zellulärer Proteine. Die beiden humanen MxA und MxB Proteine werden überwiegend durch Typ I IFN induziert (Horisberger and Hochkeppel, 1987; Goetschy et al., 1989; Simon et al., 1991). Starke antivirale Aktivität gegen RNS Viren wurde für das MxA, jedoch nicht für das MxB Protein beschrieben (Staehele et al., 1986; Di Paolo et al., 1999; Janzen et al., 2000). Für MxA wurde eine antivirale Wirkung gegen Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Inflenzavirus, Thogotovirus, Masernvirus, La Crosse Virus, Bunyaviren, Orthomyxoviridae, Paramyxoviren, Rhabdoviren, Picornaviren und Hepatitis B Virus (DNS Virus mit RNS Intermediat) gezeigt (Zurcher et al., 1992b; Landis et al., 1998; Haller et al., 1998; Di Paolo et al., 1999; Kochs and Haller, 1999; Chieux et al., 2001; Netherton et al., 2009). Die Proteine blockieren an mehreren Stellen die virale Replikation. So wird zum Beispiel bei VSV die Synthese viraler mRNA gehemmt (Schwemmle et al., 1995). Beim Inflenzavirus findet die Hemmung zu einem späteren Zeitpunkt statt (Pavlovic et al., 1992). Das Nukleoprotein, Teil des viralen Nukleokapsids von Influenza Virus A, wurde in Analysen mit reversen Genetik- und Minireplikonsystemen als ein Zielprotein von Mx1 identifiziert (Schwemmle et al., 1995; Dittmann et al., 2008; Zimmermann et al., 2011). Eine direkte Interaktion von MxA mit viralen Nukleokapsiden von Thogotovirus

wurde gezeigt, wodurch der Import des Nukleokapsids in den Zellkern blockiert wird (Kochs and Haller, 1999). Beide Mx-Proteine der Maus, Mx1 und Mx2, sind antiviral aktiv, allerdings mit unterschiedlicher Virusspezifität (Zurcher et al., 1992a). Die antivirale Aktivität von Mx Proteinen ist intrinsisch und bedarf keiner weiterer IFN induzierbarer Faktoren.

*Mx* Gene kodieren für 70-80 kDa Proteine, die die typische drei-Domänen Struktur von Proteinen der Dynamin-Superfamilie aufweisen, wobei Homologie zu Dynaminen in der G-Domäne besteht (Abb. 1.5). Die C-terminale Domäne beinhaltet einen Mx-spezifischen Leucin „Zipper“ (Melen et al., 1992). Proteine der Mx Familie besitzen weder die PRD- noch die PH-Domäne, binden jedoch an negativ geladene Membranen über die L4-Schleife und zeigen eine oligomerisierungsabhängige GTPase-Aktivität (Kochs et al., 2005; Haller et al., 2010). MxA hat eine niedrige Affinität zu GTP (20  $\mu$ M) und eine noch schwächere zu GDP (100  $\mu$ M), dabei zeigt das Protein eine relativ starke basale GTPase-Aktivität von 27  $\text{min}^{-1}$  (Richter et al., 1995). Ähnlich wie bei den Dynaminen wird für MxA eine GTP-gebundene zelluläre Form vorausgesagt. Im nukleotidfreien Zustand bilden MxA Proteine in Lösung stabile Tetramere aus (Gao et al., 2010). Die Oligomere von MxA werden in Gegenwart von nicht hydrolysierbaren GTP Analoga ausgebildet und kommen dann als Spiralen oder Helices kondensierter Ringstrukturen vor (Nakayama et al., 1993; Kochs et al., 2002). Die kürzlich gelöste Kristallstruktur der mittleren und der GED-Domänen von MxA schlägt vor, dass im ersten Schritt sich die Stapel aus diesen beiden Domänen an andere MxA Moleküle anlagern. Es entstehen lineare Oligomere, die am Ende eine Ringstruktur ausbilden. Diese Überkreuzstruktur positioniert die G-Domäne auf der einen Seite des Ringes und die Membran- und Virus-bindende Domänen (L4 und L2 Schleifen) auf der anderen Seite des Oligomers. Auf diese Weise wird eine Interaktionsfläche für die G-Domänen geschaffen, in der Ringstrukturen miteinander in Kontakt treten und so spiralförmige Strukturen ausbilden können, wodurch eine stimulierte GTP-Hydrolyse initiiert werden kann (Haller et al., 2010, Abb. 1.6; Gao et al., 2010).



**Abb. 1.6: Oligomerisierung von humanem MxA.**

MxA C-terminaler Stapel ist mit der Struktur der G-Domäne von Dynamin verknüpft. Seiten- und Frontalansicht sind dargestellt (A). Der komplette MxA Ring besteht aus 16 MxA Dimeren (B). Aus (Haller et al., 2010).

Die Selbstassemblierung wurde auch auf der zellulären Ebene in Form von großen oligomeren Strukturen gezeigt, indem das überexprimierte Protein in punktförmigen Granula im Zytoplasma IFN behandelter Zellen aggregiert (Haller et al., 2010). Es wird vorgeschlagen, dass diese Granula eine Speicherform darstellen, die die Proteine vor Degradation bewahrt und sie gleichzeitig für die Abwehr von Viren bereithält (Janzen et al., 2000; Kochs et al., 2002). Die C-terminale Domäne von MxA interagiert mit der N-terminalen G-Domäne und der Mitteldomäne und stimuliert ähnlich wie bei den Dynaminen die GTPase-Aktivität (Schwemmle et al., 1995; Schumacher and Staeheli, 1998). Sie ist außerdem in die Erkennung von viralen Zielstrukturen involviert, dabei weist die darin eingebettete „Zipper“ Sequenz die höchste Variabilität zwischen Mx Proteinen auf und könnte damit die Spezifität der antiviralen Aktivität bestimmen (Johannes et al., 1997). Die Punktmutation L612K in der GED-Domäne führt zum Block der Interaktion mit der mittleren Domäne und zur Inhibition der Oligomerisierung

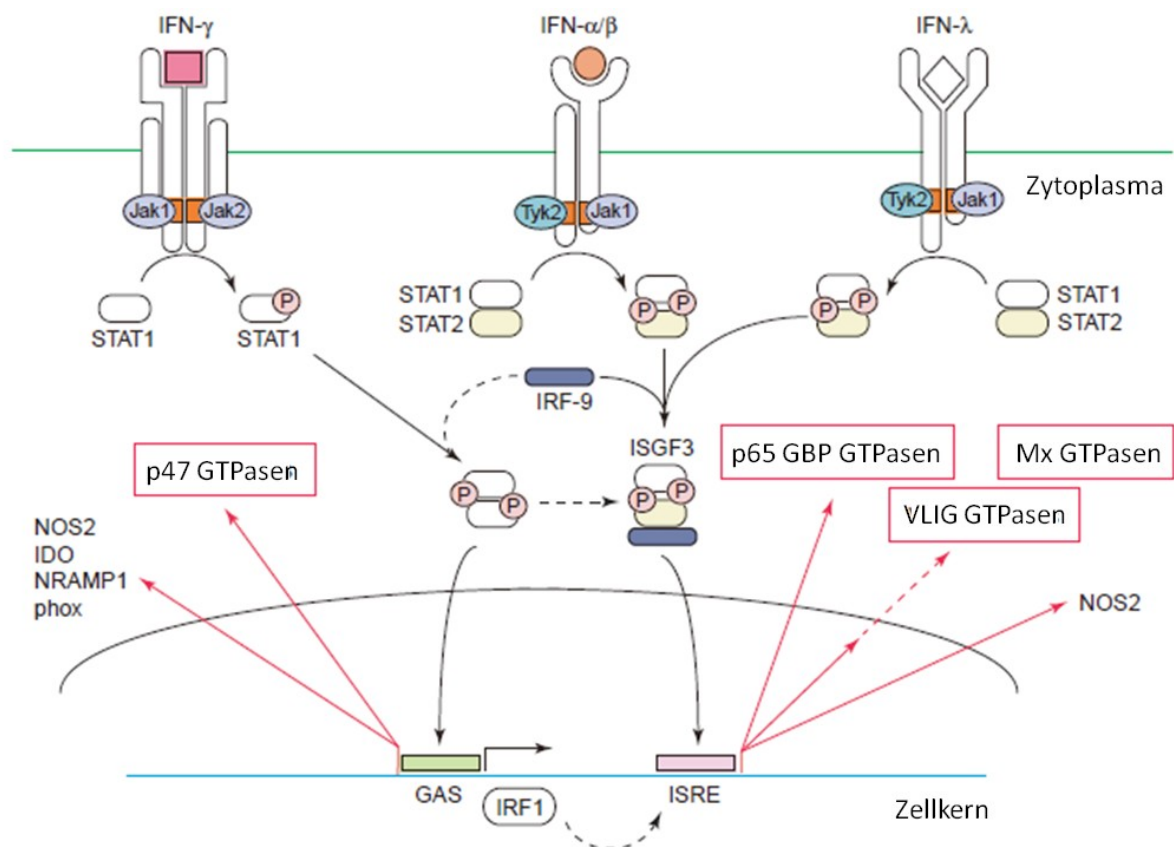
(Schumacher and Staeheli, 1998). Es wird postuliert, dass Bindung und kooperative Hydrolyse Konformationsänderungen induzieren, die für die antivirale Aktivität essentiell sind (Kochs et al., 2002). Eine andere Studie zeigt eine GTP-bindungsabhängige antivirale Funktion für MxA im monomeren Zustand (Janzen et al., 2000). Hier wird vorgeschlagen, dass eine konstante GTP-Hydrolyse die Freisetzung der antiviral aktiven Monomere von MxA aus den Depotgranula bewirken könnte (Kochs et al., 2002). Weiterhin wird postuliert, dass in infizierten Zellen die freien MxA Monomere an viralen tubulierten Nukleokapsiden zu Ringen in einem GTP/GDP-abhängigen Zyklus oligomerisieren (Janzen, C., Kochs, G. & Haller, 2000), wo die stimulierte GTPase-Aktivität Konformationsänderungen bewirkt, welche die Funktion der viralen Zielkomponenten blockiert (Haller et al., 2010). Dies unterstützt das Modell der mechanochemischen molekularen Funktion von Mx Proteinen. Die Mutation des konservierten Lysins in der P-Schleife der G-Domäne führt zum Verlust der antiviralen Wirkung. Dieser Effekt ist bei der Mutation des konservierten Threonins sogar dominant über den Wildtyp (WT) (Pitossi et al., 1993; Ponten et al., 1997).

Nach IFN Stimulation lokalisiert sowohl das humane MxA als auch das murine Mx2 homogen oder in granulären Strukturen im Zytosol, das murine Mx1 trägt hingegen eine C-terminale Zellkernlokalisationssequenz, die mit dem Leucin „Zipper“ überlappt und ist daher in Granula im Nukleus anzutreffen. Diese nukleäre Lokalisationssequenz ist für die Inhibition von Influenza Virus, Orthomyxoviren und Thogoto Viren notwendig, die im Zellkern replizieren (Staeheli and Haller, 1985; Meier et al., 1988; Zurcher et al., 1992a). Mx2 wirkt zytoplasmatisch gegen Bunyaviren (Haller et al., 1998). Für MxA wurde ebenfalls die Lokalisation am glatten Endoplasmatischen Retikulum (ER) in HEP3b Zellen beschrieben, wo es in Kontakt mit dem viralen Nukleokapsid des La Cross Virus tritt, wodurch die virale Replikation inhibiert wird (Accola et al., 2002; Reichelt et al., 2004).

## 1.4 IFN- $\gamma$ induzierbare p47 und p65 GTPasen

Micro-Array- und „suppression-subtractive hybridization“ (SSH) Analysen in murinen embryonalen Fibroblasten und in der ANA-1 M $\Phi$ -Zelllinie zeigten, dass zwei untereinander gering verwandte Familien der GTPasen, die p65 Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) und die p47 immunity related GTPases (IRGs) die IFN- $\gamma$  Antwort in beiden Zelltypen dominieren (Boehm et al., 1998; Degrandi et al., 2007).

Die beiden GTPasen Familien unterscheiden sich in der Induktionsabhängigkeit durch IFN- $\gamma$ . Die Mitglieder der p65 GBP Familie werden IFNGR abhängig unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors IRF-1 als klassische Gene der Sekundärantwort exprimiert, während die p47 IRGs, mit Ausnahme von Irga6 (IRG-47) und Irgm3 (IGTP), lediglich die Aktivierung der GAS Sequenzen durch ein STAT1 Dimer für ihre Expression benötigen und von IRF-1, zumindest in der Primärantwort, unabhängig sind (Abb. 1.1 und Abb. 1.7). Auf Proteinebene können die IRGs bereits 1 Stunde nach Stimulation und unabhängig von *de novo* Proteinbiosynthese detektiert werden, während die Banden der mGBPs frühestens 4 Stunden nach Induktion im Western-Blot zu erkennen sind (Taylor et al., 1996; Dissertation C. Konermann, 2008).



**Abb. 1.7: Expression der IFN-induzierbaren GTPasen Familien und anderer charakterisierter antimikrobieller Effektoren.**

Bindung von IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\lambda$  oder IFN- $\gamma$  an den jeweiligen Rezeptor induziert die JAK-STAT Signalkaskade. Die Spezifität ergibt sich aus der Kombination bestimmter Jaks mit einzelnen STAT Dimeren. IFN- $\gamma$  Bindung an den IFNGR führt zur Aktivierung von JAK1/2, zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT1 und der Translokation von STAT1 Dimeren in den Zellkern. Dort assembliert STAT1 in einem Komplex mit dem Ko-Aktivator Histonacetylase, der die GAS Elemente in den Promotoren IFN- $\gamma$ -induzierbarer Gene aktiviert und damit die Expression der meisten Mitglieder der p47 GTPase Familie induziert. p65 GBPs und VLIG Proteine sind sekundär aktivierte Gene und bedürfen für die volle Expression IRF-1, das an die ISRE Sequenzen bindet. Mx GTPasen werden hauptsächlich mit IFN- $\alpha/\beta$ , aber auch mit IFN- $\lambda$  induziert. Die Signalweiterleitung über JAK1 oder Tyk2 Kinasen führt zur Bindung von STAT1/2 Heterodimeren und IRF-9, welche zusammen den ISGF3 Komplex bilden und an die ISRE

Promotorsequenzen binden. Auf diese Weise werden beide Signalwege via Typ I und Typ II IFN Rezeptoren synergistisch genutzt, um das volle anti-mikrobielle Programm zu induzieren. GAS: IFN- $\gamma$  activation site; GBP: Guanylat-bindendes Protein; ISGF: Interferon-stimulierter Genfaktor; ISRE: Interferon-stimulated response element; JAK, Janus Kinase;IDO: Indoleamin-2,3-dioxygenase; IRF-1: IFN regulatory factor-1; NOS2: Stickstoffmonoxidsynthase 2 (iNOS); NRAMP1: natural-resistance associated macrophage protein-1; phox: Phagozyten Oxidase; STAT: Signal transducer and activator of transcription; Tyk, JAK Protein Tyrosinkinase; VLIIG: very large inducible GTPases. Aus (MacMicking, 2004).

Die starke Präsenz dieser beiden Protein Familien in der zellulären Antwort auf IFN- $\gamma$  Stimulation und ihre strukturelle und biochemische Diversifizierung legen die Annahme nahe, dass sie eine spezifische und wohldefinierte Funktionen in der zellautonomen Pathogenabwehr haben. Beide Familien werden stark in der Leber von Listerien befallenen Mäusen IFNGR abhängig induziert (Boehm et al., 1998; Degrandi et al., 2007).

#### 1.4.1 p47 GTPasen (immunity related GTPases)

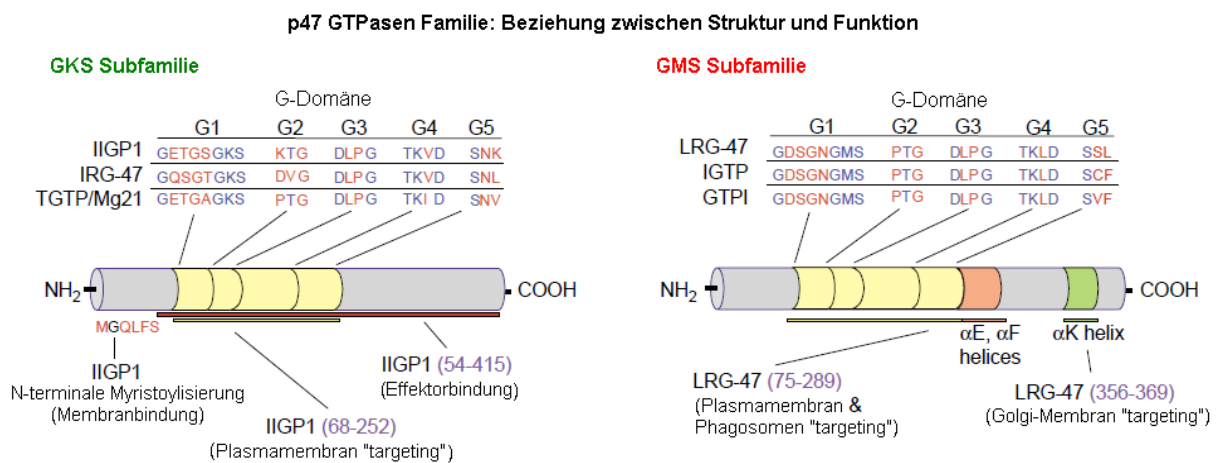
Die ersten Mitglieder der p47 GTPasen wurden als IFN oder LPS responsive Gene in murinen M $\Phi$  und Lymphozyten entdeckt (Gilly and Wall, 1992; Carlow et al., 1995; Sorace et al., 1995; Lafuse et al., 1995a). Genomische Analysen ergaben in der Maus 23 p47 immunity related GTPases (IRG) Mitglieder und 4 Pseudogene, die durch Genduplikation entstanden sind (Taylor et al., 1996; Boehm et al., 1998; MacMicking, 2004; Bekpen et al., 2005; Martens and Howard, 2006). Sieben Mitglieder dieser Familie wurden bislang zum Teil charakterisiert: *Irgd* (IRG-47), *Irgm1* (LRG-47), *Irgb6* (TGTP/Mg21), *Irgm3* (IGTP), *Irga6* (IIGP1), *Irgm2* (GTPI) und *mCINEMA* (*Irgc*). Fast alle Familienmitglieder werden durch IFN- $\gamma$ , einige, jedoch weniger stark, durch Typ I Interferon oder LPS sowohl in Immunzellen als auch nicht-Immunzellen induziert (Abb. 1.7) (Boehm et al., 1998; Zerrahn et al., 2002). Sie zählen zu den primären Genen der IFN Antwort, ihre basale Expression in der Milz, im Thymus, in der Lunge und im Dünndarm, ist sehr gering (Boehm et al., 1998). Nach der Infektion mit Protozoen, Bakterien und Viren, akkumulieren die IRGs in hoher Dichte in hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Geweben (Boehm et al., 1998; Taylor et al., 2000; Zerrahn et al., 2002).

Die IRG Familie ist im Menschen bis auf ein homologes Gen, das *irgm*, degeneriert. Dieses Gen wird allerdings nicht durch IFN induziert (Bekpen et al., 2005). Die Gene für p47 IRGs sind in der Maus in einem Cluster auf den Chromosomen 11 und 18 kodiert, lediglich ein Gen, das *mCINEMA* (*Irgc*) liegt auf dem Chromosom 7 (Bourne et al., 1990; Bourne et al., 1991). Die IRG Gene bestehen jeweils aus einem Exon. Der Vergleich der



Aminosäuresequenzen zeigt, dass bei der Familie der p47 GTPasen eine deutlich stärkere evolutionäre Diversifizierung (23-63% Aminosäurenidentität) als bei der p65 GBP Familie vorliegt, die erstere könnte daher entweder älter sein oder eine schnellere Evolution durch den Selektionsdruck erfahren haben (Boehm et al., 1998; Degrandi et al., 2007).

Die IRGs besitzen drei strukturelle Domänen: eine kurze N-terminale Region, eine zentrale GTP-bindende Region und eine lange C-terminale Region. Die p47 IRGs werden aufgrund des unterschiedlich konservierten ersten GTP-Bindungsmotivs (GX4GKS) in zwei Gruppen unterteilt: GKS und GMS GTPasen. Dabei ist in drei der GTPasen Irgm1 (LRG-47), Irgm2 (GTPI) und Irgm3 (IGTP) das konservierte Lysin in der P-Schleife durch ein Methionin ersetzt (MacMicking, 2005; Hunn et al., 2008, Abb. 1.8).



**Abb. 1.8: Struktur-Funktionsbeziehungen innerhalb der GKS und GMS p47 GTPase-Subfamilien.**

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit der kanonischen G-Domäne offenbart Substitutionen, die für die Nukleotidpräferenz (GTP vs. GDP) und die subzelluläre Lokalisation von Bedeutung sein könnten. Aus (MacMicking, 2005).

Die G-Domäne von IRGs hydrolysiert kooperativ GTP zu GDP (Vetter and Wittinghofer, 2001). Sie verfügt über drei klassische GTP-Bindemotive: P-Schleife oder G1 (GX4GK(S/T)), G3 (D/N)XXG und G4 (N/T)(K/Q)XD (Abb. 1.8). Wie bei den kleinen GTPasen hydrolysieren die ersten zwei Motive das  $\gamma$ -Phosphat und das G4-Motiv kontaktiert die Guaninbase. Zwei weitere Motive G2 und G5 sind bei den IRGs nur schwach konserviert. Bisher existiert die Kristallstruktur nur für das Irga6 (IIGP), auch biochemisch wurde diese GTPase am besten charakterisiert (Uthaiah et al., 2003; Ghosh et al., 2004; Pawlowski et al., 2011). Wie die Dynamine bindet es Nukleotide mit einer geringen Affinität im  $\mu$ M Bereich und dimerisiert GTP-abhängig (Uthaiah et al., 2003). Die Affinität zu GDP ist bei Irga6 10-fach höher als für Irgm3 (IGTP), welches zu über 90% GTP gebunden in der Zelle vorliegt (Taylor et al., 1997). Die GTPase-Aktivität von

Irga6 ist jedoch im Vergleich zu den Dynaminen erniedrigt (Sever et al., 1999; Uthaiyah et al., 2003; Papic et al., 2008). Die Mutation des konservierten Serins in der P-Schleife unterbindet die GTP-Bindung (Pawlowski et al., 2011). Das gebundene Nukleotid ist dabei Teil der katalytischen Oberfläche und die 3'-Hydroxylgruppe der GTP-Ribose, die an jede der Untereinheiten gebunden ist, ist essentiell für die Transaktivierung der Hydrolyse (Pawlowski et al., 2011). Das Strukturmodell für die Aktivierung der GTP-Hydrolyse von Irga6 ist dem Mechanismus der Signal Erkennungspartikel (SRP) und ihrer Rezeptoren (SR $\alpha$ ) nachempfunden (Focia et al., 2004; Pawlowski et al., 2011).

Die p47 IRGs werden an ihrem N-Terminus myristoyliert (Martens et al., 2004), was für die Bindung an Membranen notwendig, aber nicht hinreichend ist, denn es spielen auch hydrostatische und ionische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle, wie für Irga6 gezeigt wurde. Es gilt allgemein, dass die GKS IRGs nur schwach mit Membranen assoziieren, sie liegen gleichermaßen zytosolisch wie membrangebunden in der Zelle vor (MacMicking et al., 2003; Martens et al., 2004). Im Gegensatz dazu sind die GMS Proteine fast vollständig membranassoziiert (Martens et al., 2004).

Die Verankerung in Lipidmembranen ermöglicht den p47 GTPasen die Assoziation mit verschiedenen zellulären Kompartimenten, die in Sekretions- oder Phagozytoseprozessen involviert sind (Taylor et al., 1997; MacMicking et al., 2003; Martens et al., 2004; Kaiser et al., 2004; Itsui et al., 2009). Irgm1 bindet an *cis*- und *medial*-Golgi Zisternen und weniger prominent an das ER mit Hilfe einer C-terminalen amphipatischen Helix (MacMicking et al., 2003; Martens et al., 2004). Irgm3 und partiell Irga6 lokalisieren am ER, wobei die Bindung des Letzteren unabhängig von der Nukleotidbindung ist (Taylor et al., 1997; Kaiser et al., 2004). Für Irgm3 wird wegen der ER Lokalisation eine Funktion in der Proteinprozessierung für die Antigenpräsentation vermutet (Taylor et al., 1997).

Bei bakteriellen Infektionen werden durch die Stimulation verschiedener Immunrezeptoren Signalwege aktiviert, die zu einer 500-1000-fach erhöhten Expression der IRGs, abhängig vom Agonisten und Zelltyp führen (MacMicking et al., 2003). Am stärksten responsiv sind die p47 GTPasen auf die Stimulation von IFN- $\gamma$ , das entweder durch die T<sub>H</sub>1 abhängige Zytokinausschüttung oder durch die TLR-getriebene autokrine Stimulation freigesetzt wird (Abb. 1.9). Aber auch Typ I Interferone und LPS können zur Expression der IRGs führen. Bei der LPS Stimulation ist die Expression von IRGs MyD88 unabhängig, erfolgt über TRIF und erfordert IRF-3 (Abb. 1.9). Daneben können Komponenten der Zellwand von Mykobakterien Stämmen oder Lipoteichonsäuren Gram-

positiver Bakterien ebenfalls die Expression der IRGs stimulieren (MacMicking et al., 2003).

Infektionsstudien mit einzeln inaktivierten p47 GTPasen in Mäusen zeigen, dass es sich bei den IRGs um essentielle, nicht-redundante, anti-mikrobielle Effektormoleküle handelt (Taylor et al., 2000; MacMicking et al., 2003; Taylor et al., 2004). Irgm1 defiziente Mäuse sind stark suszeptibel gegenüber Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzii*, *Chlamydia trachomatis* und *Salmonella typhimurium* (Taylor et al., 2000; Collazo et al., 2001; MacMicking et al., 2003; Taylor et al., 2004; Feng et al., 2004; Martens and Howard, 2006; Taylor, 2007; Henry et al., 2007). Mäuse, bei denen die Gene *irgm1*, *irgm3* und *irgd* deletiert wurden, zeigen eine stark verminderte Resistenz gegen den Parasiten *Toxoplasma gondii* (Taylor et al., 2000). Irgm3 defiziente Mäuse sind daneben auch suszeptibel gegen Infektionen mit *Leishmania major* sowie Infektionen mit *Chlamydia psittaci* (Miyairi et al., 2007). Für Irga6 wurde eine wichtige Rolle in der zellulären Abwehr gegen *T. gondii* nachgewiesen (Abb. 1.9). Für Irgb6 konnte eine schwache antivirale Wirkung gegen VSV, jedoch nicht gegen Herpes Simplex Virus (HSV) (Carlow et al., 1998), sowie ein ebenso wenig ausgeprägter antiviraler Effekt von Irgm3 gegen Coxsackieviren B3 in HeLa Zellen nachgewiesen werden (Zhang et al., 2003). Eine *in vivo* Relevanz von p47 GTPasen in der viralen Abwehr wurde bisher noch nicht beschrieben.

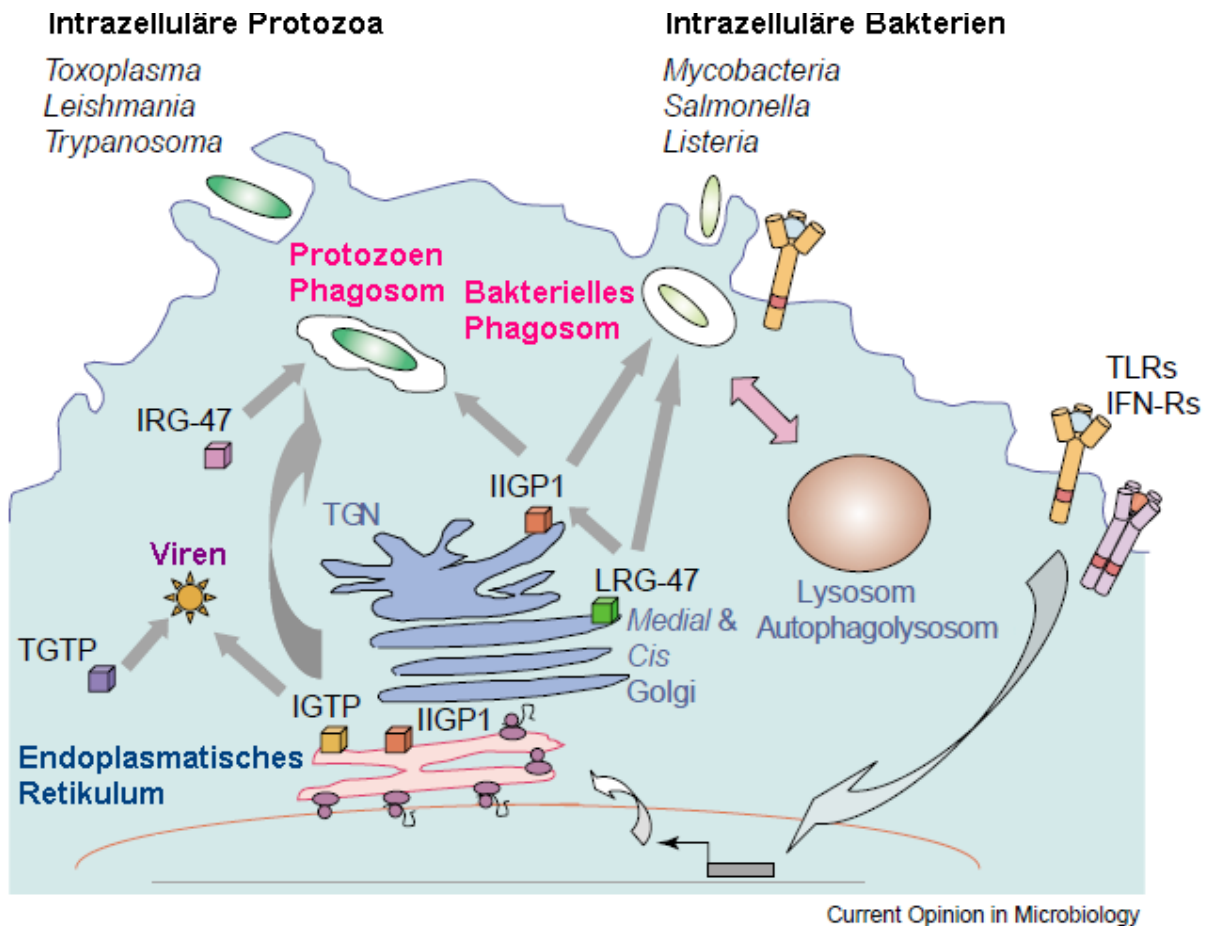


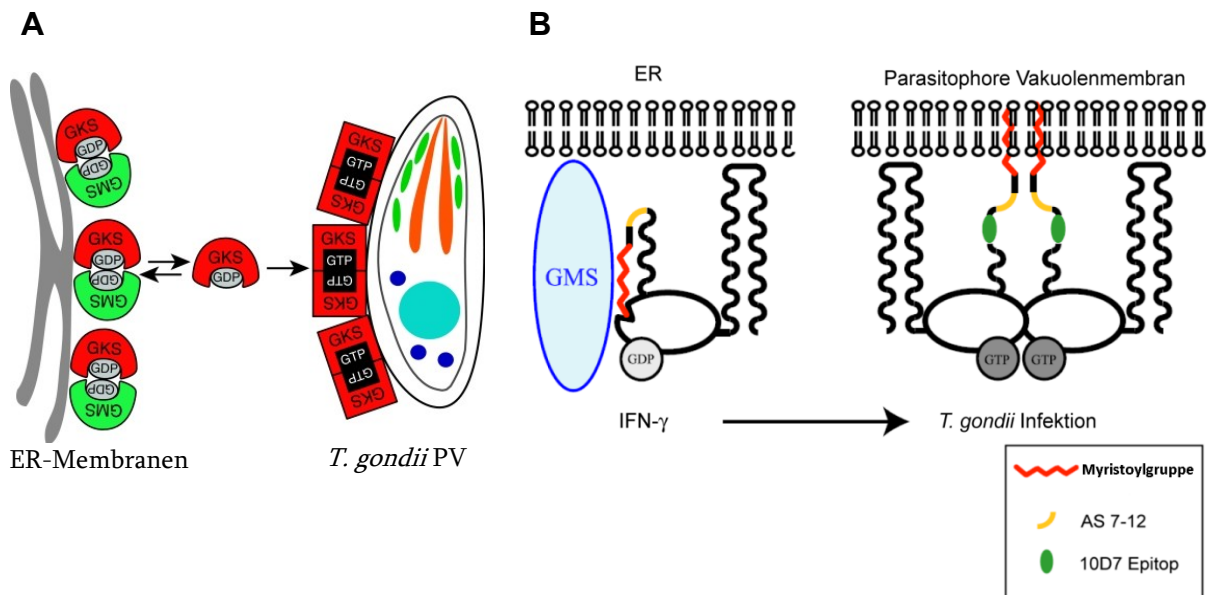
Abb. 1.9: Pathogen-spezifische Antworten der p47 GTPasen gegen Mikroorganismen, die unterschiedliche membranöse Kompartimente besetzen.

Mitglieder der p47 GTPase Familie lokalisieren entweder im Zytosol oder an Organellmembranen in uninfizierten Zellen. Wird die Zelle infiziert, translozieren GTPasen wie LRG-47 (Irgm1) und IIGP1 (Irga6) schnell zur Plasmamembran während Phagozytose. Nach der Phagosombildung und Aktindepolarisation verbleiben sie an der phagosomalen Membran während diese der (auto)phagolysosomalen Reifung unterworfen wird. Die Relokalisierung der p47 GTPasen könnte mit dem Transport mikrobizider Peptide zu Phagosomen in Zusammenhang stehen. TGN, trans-Golgi Netzwerk. Aus (MacMicking, 2005).

Die anti-mikrobiellen Wirkmechanismen der einzelnen p47 GTPasen in der Abwehr von intrazellulären Pathogenen werden intensiv erforscht. Einige der mikrobiellen Effekte der IRGs werden auf die Remodulierung der membranösen Nischen von Pathogenen oder den Einfluss auf den vesikulären Transport von oder zu Pathogen-enthaltenden Kompartimenten zurückgeführt. Mitglieder der IRG Familie, im einzelnen Irgm1 rekrutieren zu den neu gebildeten Phagosomen *M. tuberculosis* infizierter MΦ, wobei Irgm1 an der Phagosomen Membran über Interaktionen mit Phosphatidylinositolphosphaten (PIP) PI(3,4)P<sub>2</sub> und PIs(3,4,5)P<sub>3</sub> verankert wird (MacMicking et al., 2003; MacMicking, 2004; MacMicking, 2005; Tiwari et al., 2009). Irgm1 ist somit an der Zerstörung der phagosomal eingeschlossenen Mykobakterien über die Vermittlung an azidifizierte Lysosomen und die Exposition der Bakterien an

Intermediate der autophagosomalen Signalwege beteiligt (MacMicking et al., 2003; Gutierrez et al., 2004; Ling et al., 2006; Tiwari et al., 2009; Singh et al., 2010). Die Deletion von *Irgm1* resultiert in einer verminderten Ansäuerung und Reifung von Mykobakterien infizierten Phagosomen in MΦ, wobei keine anderen IFN- $\gamma$ -induzierbaren Effektor Mechanismen, wie die iNOS, Phox oder NRAMP1 beeinflusst werden (MacMicking et al., 1997; MacMicking et al., 2003; Ng et al., 2004; Malik et al., 2005). Es ist gezeigt worden, dass *Irgm1* und *Irgm3* die Ausbildung von Autophagosomen fördern können, wodurch eine bessere Kontrolle von Pathogenen gewährleistet wird (Gutierrez et al., 2004; Ling et al., 2006; Singh et al., 2010). Interessanterweise sind Mäuse, bei denen sowohl die Gene für *Irgm1* und *Irgm3* deletiert sind, nicht mehr anfällig für Infektionen mit Salmonellen (Henry et al., 2007) und Mykobakterien. Dies spricht dafür, dass eine Balance der IRG Proteinaktivität die IFN- $\gamma$  induzierte Wirtsresistenz gegen Pathogene bestimmt. Daneben spielen die IRGs eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen das parasitäre Protozoon *T. gondii* (Martens et al., 2005; Martens and Howard, 2006; Hunn and Howard, 2010). Es wurde gezeigt, dass *Irga6*, *Irgb6*, *Irgd*, *Irgm2* und *Irgm3* nach IFN- $\gamma$  Stimulation an der parasitophoren Vakuole (PV) vom avirulenten Typ II Stamm von *T. gondii* (ME49) in infizierten Astrozyten, embryonalen Fibroblasten (MEFs) und NIH 3T3 Fibroblasten akkumulieren (Martens et al., 2005; Martens and Howard, 2006; Ling et al., 2006). Für *Irga6* ist diese Rekrutierung abhängig von GTP-Bindung (Martens et al., 2005). Als Wirkmechanismus zur Bekämpfung des Parasiten wird die Zerstörung der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) mittels Vesikelabschnürung unter Beteiligung von p47 GTPasen vorgeschlagen (Taylor, 2007) Möglicherweise wird dabei die Energie aus der GTP-Hydrolyse in die mechanische Arbeit umgesetzt, die in der Deformation und letztlich dem Bruch der Vakuolenmembran resultiert (Pawlowski et al., 2011). Bemerkenswert ist, dass *Irgm1* einen Einfluss auf die Resistenz gegen *T. gondii* hat, ohne mit der PV zu ko-lokalisieren (Butcher et al., 2005). Dies suggeriert unterschiedliche Effektormechanismen für die p47 IRGs vermittelte Resistenzen gegen parasitäre Infektionen. Interessanterweise bleiben die doppel „knock out“ Mäuse für *Irgm1* und *Irgm3* im Gegensatz zu den Infektionen mit Salmonellen, suszeptibel gegenüber der *T. gondii* Infektion, was die Funktion von IRGs in der parasitären Resistenz untermauert (Henry et al., 2007). Außerdem entwickeln *Irgm1* defiziente Mäuse eine Leukozytopenie während Infektionen mit Mykobakterien und *Trypanosoma* (Feng et al., 2004; Santiago et al., 2005), aber auch während der Induktion der experimentellen allergischen Enzephalitis (EAE), was sich in diesem Fall jedoch positiv auf die Gesundheit der Tiere auswirkt (Xu et al., 2010). Die Leukozytopenie wird auf die reduzierte proliferative Aktivität des

lymphatischen Systems zurückgeführt. Dabei spielt Irgm1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der IFN- $\gamma$  induzierten Immunantwort (Feng et al., 2008a). Es wurde gezeigt, dass die drei GMS Familienmitglieder die intrazelluläre Position der GKS IRGs Irga6 und Irgb6 regulieren, in dem die Ersteren den nukleotidgebundenen Zustand der Letzteren kontrollieren und eine GTP-abhängige Aktivierung vor der Infektion verhindern (Hunn et al., 2008, Abb. 1.10 A). Die konstitutiv aktive Irga6 Mutante Irga6-K82A bildet zytosolische Aggregate und kann mit der PV der Toxoplasmen nicht mehr assoziieren. Diese zytosolischen Aggregate könnten sich außerdem zytostatisch oder zytopathisch auf Zellen des lymphomyeloiden Systems auswirken, insbesondere durch die Inhibition des Ubiquitin-Proteasomsystems (Bence et al., 2001; Hunn and Howard, 2010). Außerdem zeigt eine Studie, dass Irgm1 das Überleben von CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten IFN- $\gamma$  abhängig beeinflusst, indem es den Autophagie vermittelten Zelltod reguliert (Feng et al., 2008b).



**Abb. 1.10: Modell der Regulation von IRG Proteinen und ihre Funktion bei der Resistenz gegen *T. gondii*.**

In IFN-induzierten, uninfizierten Zellen werden die GKS IRGs (rot) im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand durch GDP abhängige Interaktionen mit GMS Proteinen (grün) an ER-Membranen festgehalten. Diese Membran-gebundene Form von GKS Proteinen ist im Gleichgewicht mit freien monomeren, GDP-gebundenen Molekülen im Zytosol. Nach der Infektion mit *T. gondii* erreichen die zytosolischen GKS Moleküle die Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) (A). Dort gehen GKS Proteine in die aktive GTP-gebundene Form über, weil sie von den GMS Proteinen nicht mehr inhibiert werden und oligomerisieren zu Homo- und möglicherweise Heterooligomeren. Dabei interagieren sie möglicherweise mit der PVM durch die Insertion der Myristoylgruppe (B). Weitere GKS Akkumulation an der PVM könnte zur Erhöhung der Avidität der GTP-gebundenen GKS Moleküle führen und damit die Proteine an der PVM stabilisieren. Dies führt letztendlich wahrscheinlich zum Zerreißen der Vakuole. Aus (Papic et al., 2008; Hunn et al., 2008).

Weiterhin wurde die Rolle der Myristoylgruppe in der GTP-abhängigen Aktivierung von Irga6 gezeigt (Papic et al., 2008), dabei kann nicht-myristoyliertes Protein nur ineffizient zur PV von *T. gondii* translozieren. Daraus wird gefolgert, dass die Myristoylgruppe für

die feste Verankerung vom aktivierten Irga6 an der PV und möglicherweise für die Irga6 vermittelte Resistenz erforderlich ist (Abb. 1.10 B).

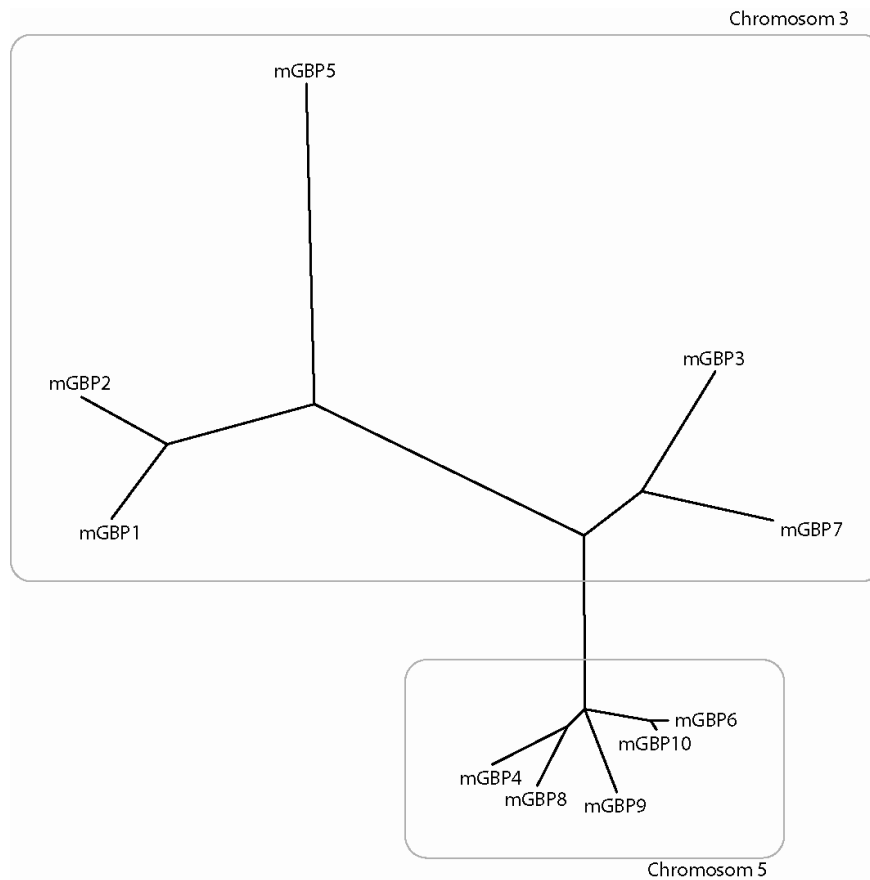
Eine weitere Studie suggeriert eine neue immunregulatorische Funktion der IRGs in der Antwort gegen Pathogene und belegt, dass IFN- $\beta$  induziertes Irgm1 in LPS-stimulierten murinen M $\Phi$  die TLR4 Signalweiterleitung inhibiert, wodurch eine überschießende proinflammatorische Antwort verhindert wird (Bafica et al., 2007).

#### 1.4.2 p65 Guanylat-bindende Proteine (GBPs)

Erstmals wurden die p65 GBPs in Zelllysaten IFN- $\gamma$  behandelter humaner Fibroblasten nachgewiesen (Gupta et al., 1979; Knight E Jr and Korant, 1979).

Die GBPs werden in vielen verschiedenen Geweben besonders durch IFN- $\gamma$ , aber auch durch Agonisten der Toll-like-Rezeptoren (TLR) und andere proinflammatorische Zytokine, induziert (Praefcke et al., 1999; Nguyen et al., 2002; Degrandi et al., 2007; Dissertation C. Konermann, 2008; Degrandi et al., 2012, eingereicht). Die Infektion mit *L. monocytogenes* und *T. gondii* führt zur Hochregulation der murinen GBPs (mGBPs) (Degrandi et al., 2007). Nach IFN- $\gamma$  Stimulation assoziieren mGBP1, 2, 3, 6, 7, und 9 mit intrazellulären Toxoplasmen, allerdings können virulente Parasiten die Rekrutierung der mGBP Proteine verhindern (Degrandi et al., 2007). Für die GBPs wurde eine basenspezifische und affinitätsäquivalente Bindung an Agarose-immobilisierte und in Lösung vorliegende Guaninnukleotide GTP-, GDP- und GMP gezeigt (Cheng et al., 1983; Cheng et al., 1985; Cheng et al., 1991; Uthaiyah et al., 2003; Wennerberg et al., 2005). Die Nukleotidaffinitäten liegen im mikromolaren Bereich und sind deutlich niedriger im Vergleich zu Ras Proteinen (Praefcke et al., 2004). Die p65 GBPs sind innerhalb der Vertebraten hoch konserviert. Bislang sind sieben Mitglieder der GBP Familie und ein *pseudogbp* Gen beim Menschen bekannt (Cheng et al., 1983; Schwemmler et al., 1996; Nguyen et al., 2002; Degrandi et al., 2007). Ihre Gene sind in einem Cluster auf dem Chromosom 1 kodiert (Olszewski et al., 2006). In der Maus konnten bis jetzt elf GBPs und zwei Pseudogene identifiziert werden, die jeweils geclustert auf Chromosom 3 (*gbp1*, *gbp2*, *gbp3*, *gbp5*, *gbp7*, *pseudogbp1*) bzw. Chromosom 5 (*gbp4*, *gbp6*, *gbp8*, *gbp9*, *gbp10*, *gbp11*, *pseudogbp2*) liegen (Cheng et al., 1991; Wynn et al., 1991; Boehm et al., 1998; Vestal et al., 1998; Han et al., 1998; Degrandi et al., 2007; Konermann et al., 2007; Kresse et al., 2008, Abb. 1.11). Es existieren ebenfalls Homologe in anderen Vertebraten (Asundi

et al., 1994; Schwemmler et al., 1996; Olszewski et al., 2006; Shenoy et al., 2012). Die mGBP Proteine weisen eine relativ hohe Identität untereinander auf (Abb. 1.11).



**Abb. 1.11: Phylogenetischer Stammbaum der p53 mGBPs.**

Die Rahmen verdeutlichen die chromosomale Lokalisation der entsprechenden Genloci im Genom der Maus. Aus (Degrandi et al., 2007).

Trotz der geringen Primärsequenzhomologie der GBPs zu Dynamin und den Mx-Proteinen, werden sie aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten als Dynamin-verwandte Proteine klassifiziert (Richter et al., 1995; Praefcke and McMahon, 2004). Gemeinsam ist den GBP Proteinen die 3-Domänenstruktur bestehend aus einer globulären etwa 300 Aminosäure großen GTP-Bindedomäne (G-Domäne), die im Vergleich zur kanonischen Ras-Struktur viele additive sekundäre Strukturelemente enthält, zwei rein helikalen, einer Mittel- (M-Domäne, etwa 150-200 Aminosäuren) und einer GED-Domäne (in der Arbeit auch als E-Domäne bezeichnet, etwa 100 Aminosäuren, Abb. 1.12), die in die GTP-Hydrolyse involviert ist (Praefcke et al., 1999; Prakash et al., 2000a; Vopel et al., 2009; Vopel et al., 2010). Zwei der Ras-typischen kanonischen GTP-Bindemotive G1 (GX4GKS) und G3 (DXXG) sind in den GBPs konserviert. Das dritte GTP-Bindungsmotiv G4 (N/T)KXD, das in anderen GTP-bindenden Proteinen für die spezifische Erkennung der



Guaninbase verantwortlich ist, ist bei den GBPs durch das RD Motiv ersetzt (Schwemmler and Staeheli, 1994; Neun et al., 1996; Praefcke et al., 1999; Nguyen et al., 2002; Praefcke et al., 2004, Abb. 1.12).

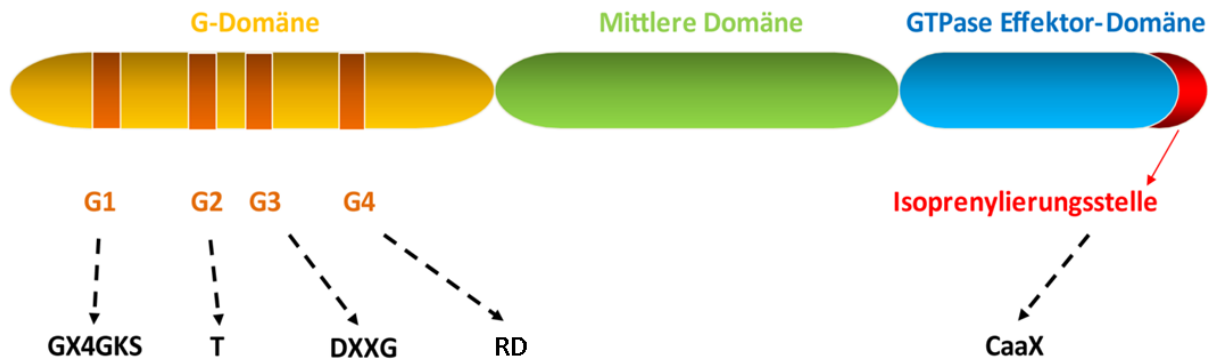


Abb. 1.12: Linearisiertes Schema der Drei-Domänen-Struktur von mGBP2.

Innerhalb der Domänen sind die Nukleotidbindungsstellen G1-G4 mit den Konsensus-Aminosäuresequenzen dargestellt. G-Domäne: GTPase-Domäne.

Die G-Domäne der GBPs ist ausgehend von den Ras GTPasen über Insertionen und Deletionen modifiziert, wodurch sich die Abstände zwischen den GTP-Bindungsmotiven im Vergleich zu anderen GTP-bindenden Proteinen unterscheiden. Die katalytisch aktive Glutaminsäure oder eine andere hydrophile Aminosäure der  $G\alpha$ - und Ras-Familien in der Region nach dem zweiten Bindungsmotiv ist in GBPs und anderen GTP-bindenden Proteinen der Dynamin-Familie durch einen hydrophoben Rest ersetzt. Da die Dynamin-verwandten Proteine trotz dieses Unterschieds eine deutlich höhere basale GTPase-Aktivität aufweisen, als die Proteine der  $G\alpha$ - und Ras-Familien, wird die GTP-Hydrolyse bei ihnen wahrscheinlich nach einem anderen Mechanismus erfolgen (Cheng et al., 1991; Vetter and Wittinghofer, 2001).

Wie bereits oben erwähnt, besitzen einige GBPs (hGBP1, hGBP2, hGBP5, mGBP1, mGBP2, mGBP5) ein CaaX Motiv an ihrem C-Terminus, welches von Prenyltransferasen erkannt wird (Stickney and Buss, 2000). Dabei entscheidet der X-Rest darüber, ob ein Farnesyl- (C15) oder ein Geranylgeranyl- (C20) Isoprenoid über einen Thioäther an das endständige Cystein geknüpft wird (Kinsella et al., 1991; Moores et al., 1991; Yokoyama et al., 1991; Zhang and Casey, 1996; Seabra and James, 1998; Fres et al., 2010). Substrate für die Farnesyltransferase (FTase) besitzen am C-Terminus die Aminosäuren Met, Ser, Ala, Gln oder Asn (z.B. hGBP1), wohingegen die Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) vorwiegend CaaX Proteine mit Leu oder Phe Resten modifiziert (z. B. mGBP2). Für einige GBPs wurde die Modifizierung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Schwemmler and

Staeiheli, 1994; Asundi et al., 1994; Nantais et al., 1996; Vestal et al., 1996; Vestal et al., 2000). Die Natur der kovalent gebundenen Isopreneinheit spielt höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der subzellulären Lokalisation der Proteine, ihrer Interaktion mit Membranen und der biologischen Funktion (Zhang and Casey, 1996). Isoprenyliertes mGBP2 lokalisiert in granulären oder vesikelartigen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas, deren Identität bislang nicht geklärt ist. Frühere Studien zeigen, dass mutiertes mGBP2, das nicht mehr isoprenyliert werden kann, diese typische subzelluläre Verteilung verliert (Vestal et al., 2000 und diese Arbeit). Die überwiegend zytoplasmatische Lokalisation von mGBP1 konnte teilweise auf eine unvollständige Modifikation am CaaX Motiv zurückgeführt werden (Stickney and Buss, 2000).

Die GBPs sind im nukleotidfreien Zustand wenig aggregationsempfindlich und besitzen die Fähigkeit GTP in zwei konsekutiven Schritten  $Mg^{2+}$  abhängig zu GMP zu hydrolysieren, wobei GDP als transientes Zwischenprodukt auftritt (Schwemmle and Staeiheli, 1994; Neun et al., 1996; Praefcke et al., 1999). Das Produktverhältnis der Hydrolyse ist jedoch Protein-abhängig. Bei hGBP1 ist GMP das Hauptprodukt der Hydrolyse, wohingegen hGBP2 hauptsächlich GDP produziert (Neun et al., 1996). hGBP5 katalysiert nur den ersten Hydrolyseschritt und produziert ausschließlich GDP (Wehner and Herrmann, 2010). Die Hydrolysereaktion von hGBP1 wird durch die Produkte GMP und GDP und durch nicht spaltbare Nukleotide GTP $\gamma$ S und GppNHp gehemmt. Im Gegensatz zum Vollängenprotein kann die G-Domäne von hGBP1 GDP nicht nur binden, sondern auch zu GMP hydrolysieren (Schwemmle and Staeiheli, 1994; Ghosh et al., 2006). Für hGBP1 wurde gezeigt, dass die GTPase-Aktivität kooperativ ist und mit zunehmender Proteinkonzentration um mindestens das 100-fache steigt (Warnock et al., 1996; Praefcke et al., 2004). Daraus wurde gefolgert, dass eine Dimerisierung (oder Oligomerisierung) für die Stimulation der Hydrolyse verantwortlich ist und weder GEFs für die Aktivierung noch GAPs für die Deaktivierung der Proteine benötigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass hGBP1 im nukleotidfreien, im GMP- sowie im GDP-gebundenen Zustand als Monomer vorliegt, jedoch in Gegenwart von GTP-Analoga oder von GDP $\cdot$ AlF $_x$  einen höheren Aggregatzustand einnimmt (Praefcke et al., 2004). Die Lösung der Kristallstrukturen der G-Domäne von hGBP1 im Komplex mit, GDP $\cdot$ AlF $_x$  und GMP ermöglichten die Aufklärung des Hydrolysemechanismus (Praefcke et al., 2004; Kunzelmann et al., 2005; Ghosh et al., 2006). Die Bindung von GppNHp führt zur Dimerisierung des Proteins, wobei beide Monomere ein Triphosphat nacheinander binden. Im GDP $\cdot$ AlF $_x$ -Komplex, der die Konformation eines Übergangszustandes

wiederspiegelt, liegt hGBP1 als Tetramer vor (Prakash et al., 2000a; Praefcke et al., 2004; Kunzelmann et al., 2005; Ghosh et al., 2006). In Analogie zu den Ras Proteinen werden durch die Dimerisierung in der Gegenwart von  $\gamma$ -Phosphaten die Switch-Regionen neu positioniert und fixiert. Die Dimerisierung wird dabei unter anderem über die Switch-Regionen vermittelt, während im Gegensatz dazu bei Ras-ähnlichen G-Proteinen die Switch-Regionen an der Effektor-Domänen-Interaktion beteiligt sind (Vetter and Wittinghofer, 2001). Kürzlich wurde die Rolle der Guaninkappe, im Detail der zwei Argininreste (R240 und R244), als strukturelles Schlüsselement für die Dimerisierung und Selbstaktivierung der GTPase-Aktivität von hGBP1 beschrieben (Wehner et al., 2012). Ihre Mutation führt zu einer höheren Dissoziationsrate der Proteine (Wehner et al., 2012). Außerdem sorgen polare intermolekulare Kontakte zwischen der Guaninkappe und den Switch Regionen für eine Übertragung der konformativen Veränderung nach der Nukleotidbindung und damit für eine kontrollierte Dimerisierung und Selbstaktivierung (Wehner et al., 2012). Ähnlich wie beim Signalerkennungsprotein-Signalerkennungsrezeptor- (SRP-SR) Komplex (Montoya et al., 2000) liegen beide Nukleotide in einer „head to head“-Anordnung vor und sind selbst nicht an der Stimulation der GTPase beteiligt (Prakash et al., 2000a; Prakash et al., 2000b). Es wird vorgeschlagen, dass während der Dimerisierung das eine Protein die GTPase-Reaktion des jeweils anderen durch Komplexbildung stimuliert und beide Monomere von hGBP1 katalytisch aktiv sind (Kunzelmann et al., 2005; Kunzelmann et al., 2006). Die Ausbildung eines Dimers ist besonders für die GMP-Produktion erforderlich (Abdullah et al., 2010).

Für den Mechanismus der hGBP1 katalysierten GTP-Hydrolyse relevant ist die Konformationsänderung von S73 in der Switch I Region, das optimal für die Koordination des angreifenden Wassers positioniert wird (Wittinghofer and Gierschik, 2000). Außerdem wird ein Arginin (R48) aus der P-Schleife, der im Nukleotid-freien und GMP-gebundenen Zustand in das Lösungsmittel ragt, durch die Interaktion mit der zweiten Untereinheit in Richtung des aktiven Zentrums orientiert. Die Überlagerung mit dem Ras-RasGAP-Komplex zeigt, dass dieses Arginin eine dem „Arginin-Finger“ vergleichbare Rolle einnimmt (Prakash et al., 2000a). Das invariante K51 in der P-Schleife kontaktiert während der GTP-Bindung und -Hydrolyse ein Paar der  $\beta$ -,  $\gamma$ -Phosphatsauerstoffe, während das  $Mg^{2+}$ -Ion das andere Paar koordiniert (Praefcke et al., 2004). Lysin Affinitätsstudien haben gezeigt, dass Interaktionen zwischen  $\beta$ -Phosphat und P-Schleife die wichtigsten Elemente für die feste Nukleotidbindung sind, so dass die strukturelle Veränderung in der P-Schleife zu stark erniedrigten Affinitäten führt (Praefcke et al.,

2004). Das  $Mg^{2+}$ -Ion wird von T75 in Switch I und von S52 in der P-Schleife von hGBP1 oktaedrisch koordiniert, wie das in kanonischen GTP-bindenden Proteinen vorgefunden wird (Prakash et al., 2000b). Zusätzlich schirmt das T75 die Phosphatgruppen des Nukleotids und das angreifende Wasser von der Lösung ab (Abb. 1.13). Bei hGBP1 ist das aktive Zentrum durch die Phosphatkappe geschützt. Im Gegensatz dazu liegt bei den Ras und Rho Proteinen die Phosphatbindestelle offen und wird durch die entsprechenden GAP Proteine abgeschirmt (Scheffzek et al., 1997; Nassar et al., 1998; Prakash et al., 2000b). Durch die hohe Flexibilität werden die Aminosäuren der Switch II Region in katalytisch aktive Positionen während der GTP-Hydrolyse gebracht.

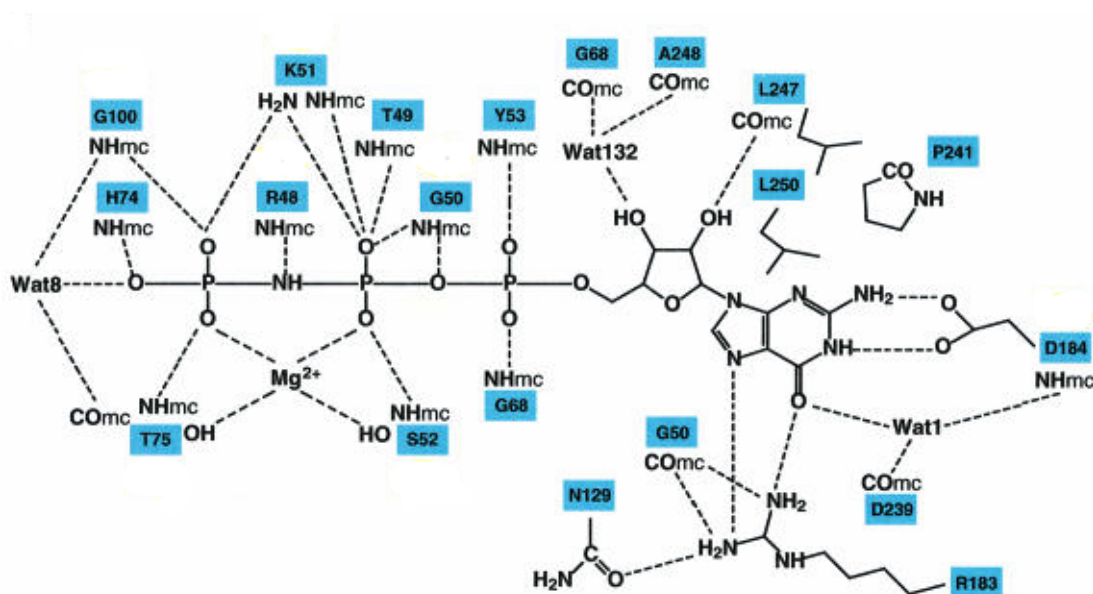


Abb. 1.13: Die Triphosphat-Struktur von hGBP1.

In blau sind die Aminosäuren des katalytischen Zentrums dargestellt, die für den Mechanismus der Nukleotidbindung und -Hydrolyse von hGBP1 relevant sind. Aus (Prakash et al., 2000a).

In neuesten Studien konnte für das hGBP1 eine zweite Interaktionsoberfläche in der helikalen Domäne identifiziert werden, die erst im Zuge der GTP-Hydrolyse zugänglich wird (Vopel et al., 2009; Vopel et al., 2010). Durch diesen zusätzlichen Kontakt wird die Tetramerisierung, genauer gesagt die Dimerisierung der Dimere, des Proteins eingeleitet.

#### 1.4.2.1 Die physiologische Funktion der GBPs

Die GBPs werden durch Typ I Interferone, Interleukine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie durch TNF- $\alpha$ , transient durch LPS, aber vor allem durch IFN- $\gamma$  in Zellen des Immunsystems und nicht-immunologischen Zellen induziert (Guenzi et al., 2001; Nguyen et al., 2002;

Lubeseder-Martellato et al., 2002; Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2012, eingereicht). In murinen M $\Phi$  und Fibroblasten gehören einige Mitglieder der mGBPs, vor allem mGBP2, mit einer Klon-Frequenz von 1,8% in der primären cDNS Bibliothek, zu den am stärksten IFN- $\gamma$  induzierbaren Genen (Boehm et al., 1998). Die STAT1 abhängigen GAS Bindesequenzen in Promotorregionen von mGBP1 und 2 sind inaktiviert (Briken et al., 1995), stattdessen fungieren zwei ISRE Sequenzen als IRF-1 Bindestellen. Frühere Studien mit Luziferase-Reportern in IRF-1<sup>-/-</sup> Fibroblasten haben gezeigt, dass die Expression von mGBP2 IRF-1 abhängig ist (Lew et al., 1991; Briken et al., 1995; Boehm et al., 1998). Die neuesten Ergebnisse, die mit Hilfe der IRF-1<sup>-/-</sup> Maus gewonnen wurden, bestätigen dies (Degrandi et al., 2012, eingereicht). Die mGBPs sind daher klassische sekundär responsive Gene. hGBP1 gehört ebenfalls mit  $3 \times 10^5$  Molekülen pro Zelle zu den am stärksten induzierbaren Proteinen in humanen Fibroblasten nach IFN- $\gamma$  Stimulation (Cheng et al., 1985; Nicolet and Paulnock, 1994). Das Gen, welches mGBP2 kodiert, hat eine Gesamtlänge von 17,4 kb (Kresse et al., 2008). Der kodierende Bereich ist in elf Exone aufgeteilt. Das offene Leseraster umfasst 1767 Basen und kodiert für ein Protein von 589 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 66,7 kDa. Das hGBP1 Protein (Cheng et al., 1983) und das mGBP2 (Briken et al., 1995) weisen mit 68% Aminosäureidentität, besonders in der GTPase-Domäne eine hohe Ähnlichkeit auf (Olszewski et al., 2006; Kravets et al., 2012).

Zur molekularen Funktion der GBPs ist trotz ihrer starken Induktion durch IFN- $\gamma$  wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass sowohl mGBP2 als auch hGBP1 eine Funktion bei der Regulation des Zellwachstums haben (Guenzi et al., 2001; Gorbacheva et al., 2002). hGBP1 beeinflusst die Invasion von Endothelzellen (EZ) in die Kollagen I Matrix, indem es die Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMP) herunter reguliert (Guenzi et al., 2003) und inhibierend auf die Zellproliferation, Migration und Invasion von EZ über die Induktion der Expression von Integrin  $\alpha 4$  wirkt (Weinlander et al., 2008). Die durch retroviral exprimierte hGBP1 induzierte Hemmung der Proliferation ist unabhängig von der GTPase-Aktivität sowie von den posttranslationalen Modifikationen von hGBP1 (Guenzi et al., 2003). Andererseits hat eine Überexpression von mGBP2 in NIH 3T3 Fibroblasten ein erhöhtes Zellwachstum zur Folge, welches von einer intakten GTP-Bindestelle abhängig ist (Gorbacheva et al., 2002). Außerdem wird hGBP1 mit der Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) Resistenz von ovariellen Tumorzellen und der Entstehung von Multidrug-Resistenzen (MDR) in Zusammenhang gebracht (Duan et al., 2006). Weiterhin wurde eine Rolle für hGBP1 bei der Regulation der Barrierefunktion von intestinalen EZ

beschrieben, wobei die Apoptose beeinflusst wurde (Schnoor et al., 2009). hGBP1 wird zudem mit verringerter Angiogenese von Tumoren in Patienten mit kolorektalem Karzinom assoziiert, wobei für den anti-angiogenetischen Effekt, anders als beim anti-proliferativen Effekt, die Notwendigkeit der GTPase-Aktivität von hGBP1 beschrieben wurde (Naschberger et al., 2008). Für mGBP2 wurde eine inhibierende Rolle bei der zellulären Mobilität von Fibroblasten nachgewiesen (Messmer-Blust et al., 2010).

Es häufen sich experimentelle Befunde, die die Rolle von p65 GBPs in der Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene belegen. Eine schwache antivirale Wirkung konnte für hGBP1 in Hela Zellen und für mGBP2 in NIH 3T3 Fibroblasten gegen das VSV und das Encephalomyocarditis Virus (EMCV) gezeigt werden (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Aus Mutationsanalysen geht hervor, dass die antivirale Aktivität von hGBP1 auf EMCV GTP-bindungsabhängig ist. Die Inhibition der Proliferation von VSV durch mGBP2 ist von der GTP-Bindung unabhängig, bedarf jedoch der C-terminalen Domäne mit dem CaaX-Motiv, was auf unterschiedliche Effektormechanismen der Proteine in Abhängigkeit vom Virustyp hindeuten könnte (Carter et al., 2005). Der beobachtete antivirale Effekt ist allerdings deutlich geringer als der von MxA (Netherton et al., 2009). Kürzlich wurde die Rolle für mGBP7 in der Vermittlung der oxidativen Resistenz gegen Mykobakterien gezeigt (Kim et al., 2011). Es unterstützt die Assemblierung der Komponenten der Phagozyten Oxidase auf mykobakteriellen Phagosomen. Außerdem ist mGBP7 zusammen mit mGBP1 am Transport monoubiquitiniertes Proteine zu Autolysosomen beteiligt, wo diese zu Generierung von anti-mikrobiellen Peptiden degradiert werden, wobei mGBP1 direkt mit dem autophagosomalen Adapterprotein p62 interagiert und mGBP7 das Protein Atg4b für die LC3 abhängige Membranelongation zum Autophagosom transportiert (Kim et al., 2011). In unserem Labor wurde kürzlich eine starke Induktivität der mGBPs nach IFN- $\gamma$  Stimulation *in vitro* und *in vivo* nach Infektion der Mäuse mit dem gram-positiven Bakterium *L. monocytogenes* oder dem Parasiten *T. gondii* nachgewiesen. Dabei rekrutierten mehrere mGBPs, darunter mGBP2, zu der parasitophoren Vakuole (PV) der avirulenten *T. gondii* vom Typ II Stamm (ME49) (Degrandi et al., 2007; Kresse et al., 2008). Daraufhin wurde in unserem Labor eine mGBP2 defiziente Mauslinie etabliert (Dissertation C. Konermann, 2008), welche durch eine erhöhte Mortalität und Morbidität zu *T. gondii* Infektionen und eine höhere Zystenanzahl im Gehirn gekennzeichnet ist (Degrandi et al., 2012, eingereicht).

## 1.5 *Toxoplasma gondii*

Das Protozoon *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist ein obligat intrazellulärer Parasit. Es ist weltweit verbreitet, jedoch ist die Prävalenz in verschiedenen Regionen der Erde sehr unterschiedlich. Die geringe Wirtsspezifität befähigt *T. gondii* zur Infektion eines breiten Spektrums warmblütiger Vertebraten. Schätzungsweise 30-70% der Weltbevölkerung sind mit dem Parasiten infiziert (Dubey, 1987). Als Erreger der Toxoplasmose bei Immunsupprimierten und Neugeborenen hat *T. gondii* in den letzten Jahren an medizinisch-klinischer Bedeutung gewonnen. Der Erreger wurde unabhängig von zwei Gruppen von Wissenschaftlern entdeckt. Nicolle und Manceaux isolierten den Parasiten aus dem nordafrikanischen Nager *Ctenodactylus gundi* 1908 in Tunesien und Splendore fand ihn in São Paulo, Brasilien (Ferguson, 2009). Als menschliches Pathogen wurde es 1939 von Wolf, Cowen und Paige (Wolf et al., 1939) erkannt, die von einer kongenitalen Toxoplasmose bei einem Kind berichteten. Die Forschung an *T. gondii* wird aus zwei wichtigen Gründen vorangetrieben. Erstens können *Toxoplasma* die Ursache schwerer und sogar lebensbedrohlicher Erkrankungen wie Encephalitis, Retinitis und Myocarditis (Pinon et al., 2001; Jones et al., 2006; Montoya and Remington, 2008) während der fötalen Entwicklung und bei immungeschwächten Patienten sein (Luft and Remington, 1992; Kim and Weiss, 2008). Zweitens dient *T. gondii* als ein Modellsystem für andere verwandte Parasiten wie *Plasmodien*, den Erregern von Malaria; *Eimeria*, den Erreger der Geflügel Kokzidiose und *Cryptosporidium*, ein weiteres wichtiges opportunistisches Pathogen bei Patienten mit erworbener Immundefizienz AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) (Kim and Weiss, 2004).

*T. gondii* wird taxonomisch dem Stamm der Sporozoen/Apicomplexa und hier der Subklasse Coccidia zugeordnet. Es ist der bislang einzige bekannte Vertreter der Gattung *Toxoplasma*. Der Name *Toxoplasma* (*toxos*, griechisch Bogen, *plasma*, griechisch Form, Gebilde) rührt von der sichelförmigen Gestalt des Parasiten her. Charakteristisch für den Erreger sind die infektiösen Sporozoiten, ein Apikalkomplex und der Generationswechsel zwischen geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Formen.

Der komplette dreiphasige Lebenszyklus von *T. gondii* wurde erst 1970 aufgeklärt (Frenkel et al., 1970; Dubey et al., 1970a; Dubey et al., 1970b). In der Entwicklung von *T. gondii* werden eine enteroepitheliale, eine exogene und eine extraintestinale Phase unterschieden, die mit dem Wirtswechsel verbunden sind (Dubey et al., 1997; Dubey et al., 1998; Dubey, 2004, Abb. 1.14).

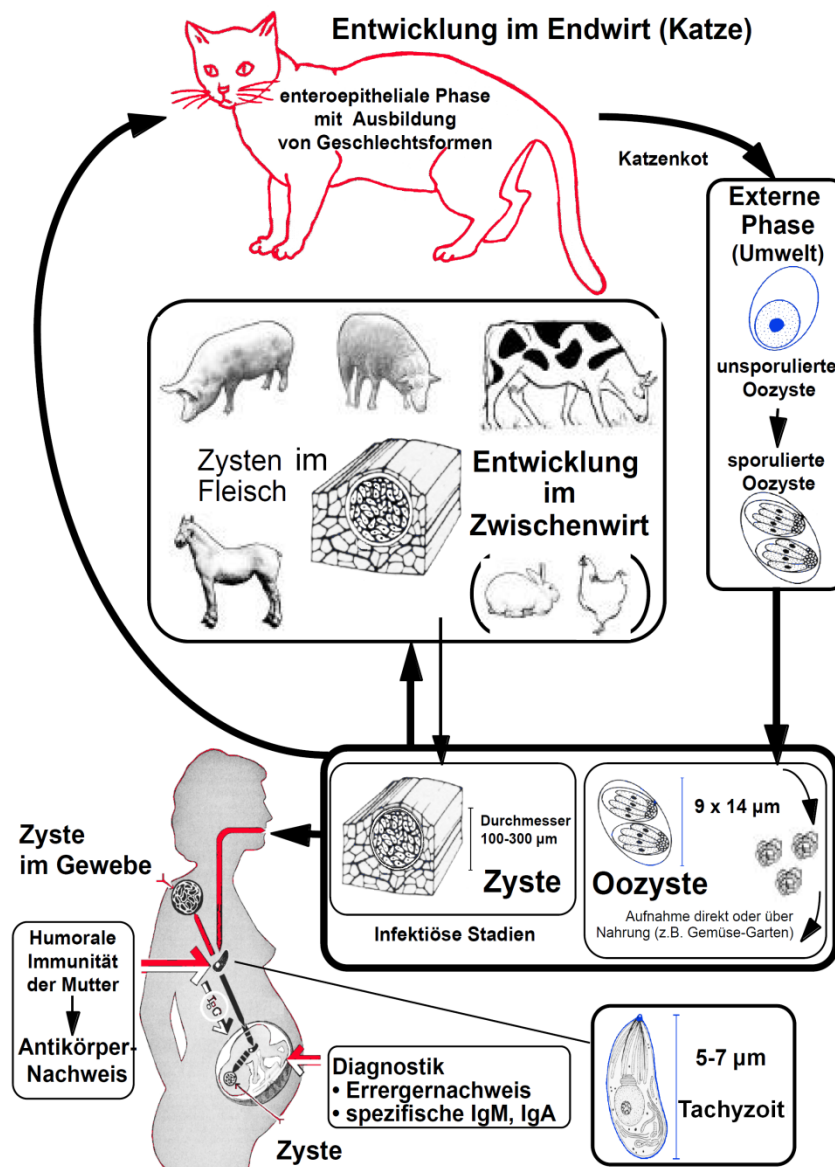


Abb. 1.14: Lebenszyklus von *T. gondii*.

Aus <http://www.ipa.vetsuisse.unibe.ch/pub/MedParaToxo.pdf>.

Der Parasit gelangt in den Endwirt über Karnivorie von infizierten Zwischenwirten (Dubey, 2009). Die enteroepitheliale Phase, mit Ausbildung von Geschlechtsformen (Gametogonie) von *T. gondii* vollzieht sich nur im Epithel des Dünndarmes der Hauskatze und einiger anderer feliden Tierarten (Endwirt) und wird mit der Ausscheidung von diploiden Oozysten im Kot abgeschlossen. In der externen Phase findet die Reduktionsteilung der Oozyste zu acht Sporozoiten statt, die für viele Arten von Zwischenwirten (Säugetiere, Vögel) hochinfektiös sind. Die extraintestinale Phase wird durch die Aufnahme sporulierter Oozysten oder Gewebezysten durch Zwischenwirte eingeleitet (Dubey and Frenkel, 1976). Für *T. gondii* sind drei Übertragungsmodi bekannt: kongenital, durch den Verzehr von rohem Fleisch und über Fäkalien (Dubey et al., 1986).



Nach der Auflösung der Zystenwand im Magen, werden langsam wachsende Gastropeptidasen-resistente Bradyzoiten freigesetzt, die anschließend in das Dünndarmgewebe eindringen (Tenter et al., 2000). Dort differenzieren sie sich zu schnell proliferierenden, krankheitserregenden Tachyzoiten, welche nach 48 Stunden ihre Wirtszellen lysieren. Tachyzoiten tragen als spezifische Oberflächenantigene das Surface Antigen (SAG) 1 und SAG2 (Kasper, 1989). Nach der Penetration des Darmepithels halten sich die Toxoplasmen vorübergehend im Blut oder in der Lymphe auf und werden dann zur Lamina propria transportiert. Ihre asexuelle Vermehrung findet im Zytoplasma zellkerntragender Wirtszellen, vorzugsweise im retikuloendothelialen System, in der Muskulatur und im Zentralnervensystem (ZNS) statt. Durch wiederholte Zellteilung entstehen in einer parasitophoren Vakuole innerhalb der Wirtszelle 16-32 Tochterindividuen. Beim Platzen der Zellwand werden die Tachyzoiten frei und befallen Zellen in anderen Geweben des Wirtsorganismus (Frenkel, 1988; Ajioka et al., 2001). Durch Wiederholung dieses Vorganges entstehen im Gewebe lokale Schädigungen in Form von fokalen Nekrosen, die von inflammatorischen Reaktionen begleitet werden. Solche Läsionen findet man vor allem im Gehirn, in der Herz- und Skelettmuskulatur, in der Leber, in der Retina und in der Plazenta. *T. gondii* produziert keine Toxine. Die akute Phase der Infektion hält an, bis der Wirt stirbt oder eine Immunitätsreaktion einsetzt, die zur Eliminierung eines Großteils der Parasiten führt. Durch die Abwehrmechanismen des Wirts wird die intrazelluläre Vermehrung eingedämmt, wodurch *T. gondii* bei immunkompetenten Individuen in das langsam wachsende Stadium des Bradyzoiten rückkonvertiert (Soete et al., 1994). Auch Bradyzoiten exprimieren spezifische Antigene wie das Bradyzoite Antigen (BAG) 1 bzw. 5 oder das Oberflächenantigen SAG4 (Parmley et al., 1994; Bohne et al., 1995; Parmley et al., 1995; Yang and Parmley, 1995; Odberg-Ferragut et al., 1996). Bradyzoiten liegen in der chronischen Phase der Infektion in Gewebezysten mit bis zu 2000 Parasiten vor (Weiss and Kim, 2007). Die Zysten führen zu keiner akuten Pathologie. Sie können prinzipiell in allen Geweben entstehen, zeigen jedoch eine deutlich höhere Prävalenz im neuronalen und muskulären Gewebe. In diesen Gewebezysten persistiert *T. gondii* vermutlich lebenslang im Wirt. Bei Zusammenbruch der Immunität, aber auch bei herabgesetzter Resistenz durch interkurrente Krankheiten, Verletzungen usw. ist jedoch die Reaktivierung einer chronischen Infektion durch Ruptur einzelner Zysten möglich (Montoya and Liesenfeld, 2004). Die durch Tachyzoiten induzierte proinflammatorische Immunreaktion kann allerdings ebenfalls zu Gewebeschäden führen. Folglich ist eine Balance zwischen Induktion und Evasion der

Immunantwort für die Etablierung der chronischen Infektion von *T. gondii* von grundlegender Bedeutung.

Alle drei Entwicklungsstadien, schnell vermehrende Tachyzoiten, ruhende Bradyzoiten und Sporozoiten, besitzen gemeinsame morphologische Charakteristika (Abb. 1.15).

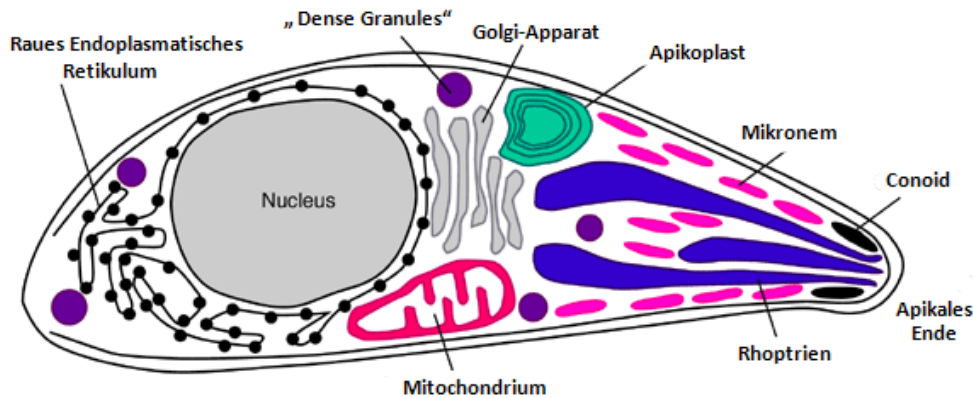


Abb. 1.15: Struktur von *T. gondii*.

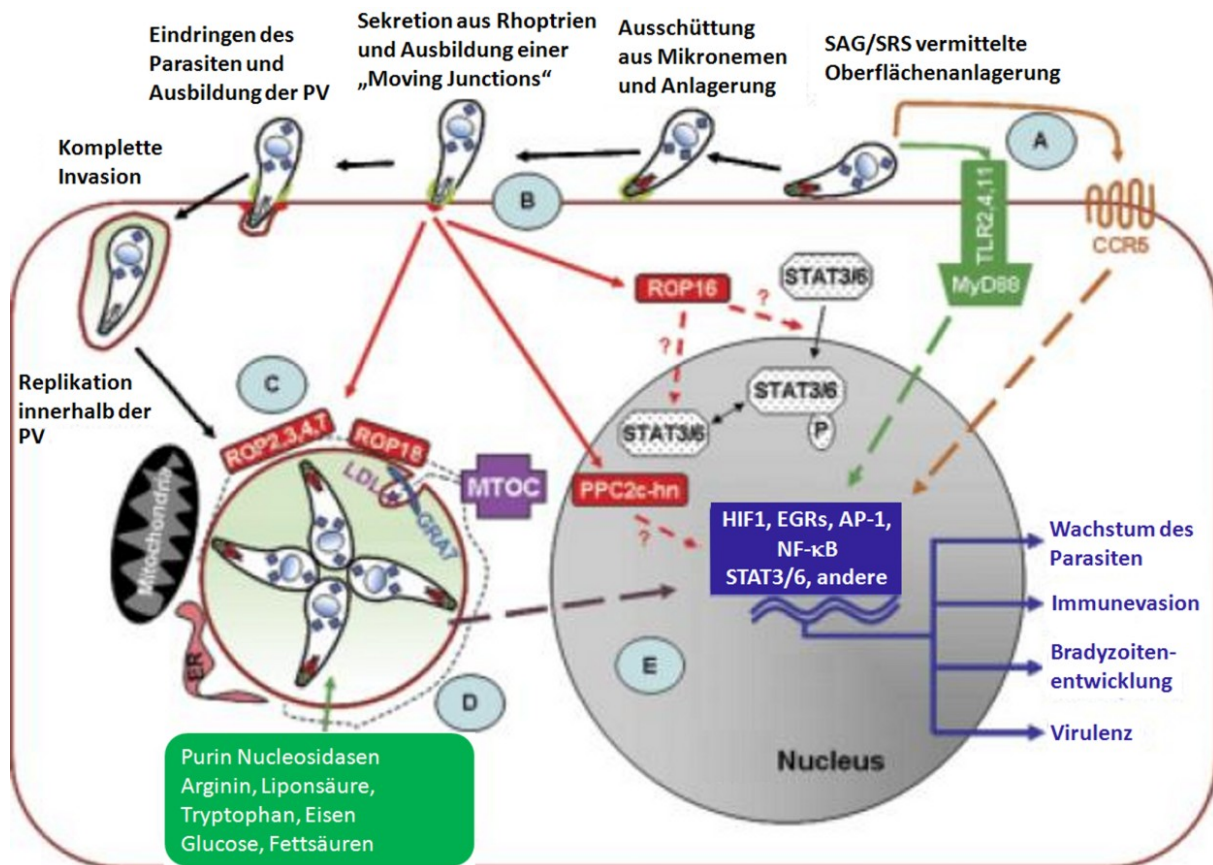
Nach [http://www.laborwissen.de/wiki/img/wiki\\_up/Toxo\\_ultrastructure.gif](http://www.laborwissen.de/wiki/img/wiki_up/Toxo_ultrastructure.gif).

Der Parasit besitzt die typischen Organellen eukaryotischer Organismen und ist von einer dreischichtigen Pellicula umgeben, deren äußere Membran ihn vollständig umschließt. Die beiden dicht aufeinanderliegenden inneren Membranen enden am anterioren und posterioren Polring. Das Mikrotubuli-Zytoskelett durchzieht vom Polring aus fast die gesamte Zelle. Aktin- u. Myosinmikrofilamente, die bevorzugt im apikalen Teil des Parasiten zu finden sind, dienen der Motilität der Parasiten. Als charakteristische Strukturen finden sich im Apikalkomplex von *T. gondii* das Conoid, die „Dense Granules“, die die GRA Proteine beinhalten, und die sekretorischen Organellen Rhoptrien und Mikronemen (Dubey et al., 1998), deren Sekret die Penetration und Invasion der Wirtszelle erleichtern soll (Carruthers, 2002).

Die Invasion der Wirtszelle durch *T. gondii* Tachyzoiten ist ein aktiver Prozess, der zwar nur 15 Sekunden dauert, (Smith, 1995; Carruthers, 1999; Carruthers et al., 1999; Sibley and Andrews, 2000) aber aus vielen unabhängig regulierten Schritten besteht. Zunächst lagert sich der Parasit mit einer geringen Affinität an die Zelloberfläche der Wirtszelle an. Diese Interaktion wird durch die Oberflächenproteine des Parasiten vermittelt, von denen die meisten Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine der Familien SAG, SRS (SAG-related sequences) und SUSA (SAG-unrelated surface antigens) sind (Boothroyd et al., 1998; Pollard et al., 2008). Für die Gleit-Motilität während der Invasion ist das Aktin-Myosin-Skelett des Parasiten verantwortlich (Sibley, 1993). Die Anlagerung

induziert einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Wirtszelle. Die Invasion des Parasiten wird durch die Freisetzung von Adhäsinen aus Mikronemen komplettiert, die mit den Oberflächenfaktoren der Wirtszelle interagieren (Carruthers and Sibley, 1997; Zhou et al., 2005; Carruthers and Boothroyd, 2007). Daraufhin erfolgt die Sekretion der Inhalte aus den Rhoptrien ins Zytoplasma und die Ausbildung der sog. „Moving Junctions“, die den Invasionsprozess vorantreiben (Alexander et al., 2005; Straub et al., 2009). Während des Invasionsprozesses wird die Plasmamembran der Wirtszelle eingestülpt und bildet letztlich die Membran der parasitophoren Vakuole (PV), die den Parasiten umschließt (Hakansson et al., 2001). Es werden parasitäre Faktoren freigesetzt, die entweder mit der PV interagieren (ROP2 Familie und ROP18) oder ins Zytoplasma der Wirtszelle (ROP16) oder in den Zellkern (PP2C-hn, Gilbert et al., 2007) transportiert werden. Einige dieser Faktoren wie ROP16 und ROP18 Familienmitglieder gehören zu den polymorphen Virulenzfaktoren. Aus der PV werden Transmembranproteine und membranassoziierte Wirtspoteine (ausgenommen die GPI-verankerten Proteine), entfernt und unter anderem durch Rhoptrienproteine ersetzt (Mordue et al., 1999; Joiner and Roos, 2002; Charron and Sibley, 2004). Die Modifikation der PV Membran (PVM) durch *T. gondii* verhindert, dass die Vakuole mit endozytotischen Kompartimenten des Wirts fusioniert und ihr Inhalt in Lysosomen degradiert wird (Hakansson et al., 2001). Damit stellt die PV ein sicheres Kompartiment dar, in dem der Parasit seine intrazelluläre Replikation durchführen kann (Lingelbach and Joiner, 1998). Intrazelluläre Parasiten initiieren im Folgenden die Reorganisation der Mitochondrien und des ER und rekrutieren das Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) sowie die Elemente des Zytoskeletts der Wirtszelle, wie das Vimentin zur PV (Halonen and Weidner, 1994; Sinai et al., 1997; de Souza, 2005; Martin et al., 2007). Die Mitochondrien, als Ort des Fettsäuremetabolismus, dienen dem Parasiten als Lipidquelle, z.B. für Liponsäure (Sinai and Joiner, 1997; Crawford et al., 2006), wohingegen Phospholipide vom ER bezogen werden (Gupta et al., 2005). Die Mikrotubuli des Wirts, die mit LDL-Cholesterin beladen sind, bilden daraufhin eine Verbindung mit der PV aus und werden über das Protein GRA7 aus den „Dense Granules“ von *T. gondii* verankert (Sehgal et al., 2005; Coppens et al., 2006; Walker et al., 2008). Die Mikrotubuli-vermittelten Einstülpungen der PVM, auch genannt tubulo-vesikularäres Netzwerk (TVN) (Sibley et al., 1995), die mit GRA7 beschichtet sind, dienen als Kanäle für die Sequestrierung von niedermolekularen Verbindungen aus dem endo-lysosomalen System (Coppens et al., 2006). Lösliche Moleküle bis 1300 Da passieren die PVM über parasitäre Membran-Kanäle, wodurch die Versorgung der Parasiten mit Nährstoffen gewährleistet wird (Schwab et al., 1994; Fox et al., 2004).

*T. gondii* infiziert vorwiegend Zellen in der S-Phase (Youn et al., 1991) und verursacht den Zellzyklus-Arrest der infizierten und benachbarten Zellen zwischen G2- und M-Phasen (Brunet et al., 2008; Molestina et al., 2008). Der Parasit moduliert die Expression von mehr als 1000 Wirtsgenen (Chaussabel et al., 2003). Diese Gene kodieren für Proteine, die in Entzündungsprozessen, Apoptose, Metabolismus, Zellwachstum und Differenzierung beteiligt sind. Die Genexpression der Wirtszelle wird entweder durch eine direkte Interaktion der *T. gondii* Faktoren mit wirtseigenen Transkriptionsfaktoren aktiviert (Phelps et al., 2008) oder durch die Manipulation der Signalwege der Wirtszelle reguliert (Shapira et al., 2005; Molestina and Sinai, 2005a; Molestina and Sinai, 2005b). Änderungen des Expressionsprofils der Wirtszelle begünstigen entweder Proliferation (Spear et al., 2006), Immunevasion und Virulenz, oder führen zur Bradyzoiten-Entwicklung (Abb. 1.16).



**Abb. 1.16: *T. gondii*-Wirtszell-Interaktionen.**

Angeborene Immunantworten werden über TLRs und Cystein-Cystein Chemokin-Rezeptors 5 (CCR5) Erkennung von *T. gondii* Faktoren induziert (A). Die Parasitäre Invasion wird durch die Freisetzung von Adhäsinen aus Mikronemen eingeleitet, die mit den Oberflächenstrukturen der Wirtszellen interagieren. Anschließend werden die Moleküle aus Rhoptrien sekretiert, wodurch "moving junctions" ausgebildet wird (B). Intrazelluläre Parasiten reorganisieren die Wirtsmitochondrien, ER, sowie das MTOC um die PV herum. Mikrotubuli des Wirts, die mit LDL-Cholesterin beschichtet sind, formen Membrantubuli, die über GRA7 in die PV integriert werden (C). Lösliche Nährstoffmoleküle diffundieren frei über die PV und

werden vom Parasiten über Membrantransporter aufgenommen (**D**). Die Transkription der Wirtszellen wird entweder direkt über parasitengesteuerte Aktivierung wirtseigener Transkriptionsfaktoren oder durch die Regulierung der Signalkaskaden der Wirtszelle induziert (**E**). Aus (Blader and Saeij, 2009).

In Nordamerika und Eurasien ist die Populationsstruktur von *T. gondii* auffällig klonal. Untersuchungen zur Antigenstruktur und zur Ausprägung von Allelen verschiedener Strukturgene haben schließlich zur Klassifikation in drei spezieinterne Gruppen geführt (Darde et al., 1992; Cristina et al., 1995; Howe and Sibley, 1995; Ajzenberg et al., 2004; Sibley and Ajioka, 2008). Die Linien weisen eine 98% Ähnlichkeit auf der DNS-Ebene untereinander auf. Polymorphismen haben ein biallelisches Muster an fast allen Loci, was darauf hinweist, dass sie in der Wildnis durch wenige Rekombinationen, gefolgt von klonaler Expansion innerhalb von etwa 10.000 Jahren entstanden sind (Sibley and Boothroyd, 1992; Boyle et al., 2006). Trotz der genetischen Ähnlichkeit der *T. gondii* Stämme verursachen die Infektionen phänotypische Differenzen in Mäusen. Die Gruppe I besteht aus extrem mausvirulenten Stämmen, die signifikant höhere Parasitämien verursachen. Eine Infektion mit 10 oder weniger Tachyzoiten führt bereits zu einer tödlich verlaufenden akuten Infektion (Sibley and Boothroyd, 1992; Denkers, 1999; Saeij et al., 2007). Isolate der Gruppen II und III sind schwach virulent in der Maus. Diese *T. gondii* Stämme führen bei subletalen Dosen zu einer persistierenden latenten Infektion mit hohen Zahlen an Gewebezysten. Stämme dieser Gruppen stellen den Großteil der Erreger humaner Toxoplasmosen dar (Howe and Sibley, 1995; Howe et al., 1997). Beim Menschen unterscheiden sich die drei Linien in der Präferenz der Organe, die sie befallen und im Zeitpunkt der Infektion. Typ I Stämme werden mit postnatalen okularen Infektionen assoziiert, wohingegen Typ II Stämme häufiger die Ursache für kongenitale Infektionen und für die Ausbildung der toxoplasmatischen Enzephalitis sind (Boothroyd and Grigg, 2002). Typ I Stämme wie RH und GT-1 zeigen eine höhere Motilität und verbreiten sich sehr schnell in Mäusen, was ebenfalls zur Virulenz beitragen kann (Barragan and Sibley, 2002; Barragan and Sibley, 2003), wohingegen Typ II *T. gondii* Stämme wie ME49, PTG das Migrationsverhalten ihrer Wirtszellen modulieren (Lambert et al., 2011). Außerdem induzieren Typ II Stämme eine deutlich stärkere Immunantwort, unter anderem eine erhöhte IL-12 Produktion (Robben et al., 2004). Quantitative phänotypische Analysen zeigten, dass Polymorphismen in Loci, die für ROP Proteine ROP18, ROP16 und ROP5 kodieren, die Virulenzunterschiede verschiedener Stämme bestimmen (Su et al., 2002; Taylor et al., 2006; Saeij et al., 2006; Behnke et al., 2010; Steinfeldt et al., 2010). Die Serin/Threonin Kinasen der ROP16 Familie aus Typ I *T. gondii* phosphorylieren direkt STAT3 und STAT6 in MΦ, wodurch sie die Aktivierung dieser

Transkriptionsfaktoren verlängern. Dadurch wird die IL-6/IL-12 p40 und TNF- $\alpha$  Zytokinproduktion reduziert (Yamamoto et al., 1997; Shapira et al., 2005; Saeij et al., 2007; Ong et al., 2010). Darüber hinaus phosphorylieren die, in die PVM integrierten und zum Zytoplasma der Wirtszelle gekehrten, polymorphen Kinasen der ROP18 Familie aus Typ I Stämmen (Taylor et al., 2006; El Hajj et al., 2007) Mitglieder der murinen immun-induzierten Familie der GTPasen (p47 IRGs), die die Resistenz gegen avirulente *T. gondii* Stämme vermitteln (Steinfeldt et al., 2010). Dies führt zur Abschwächung der autonomen Immunantwort der Zelle (Martens et al., 2005; Zhao et al., 2009b; Steinfeldt et al., 2010; Khaminets et al., 2010). Der Transfer des Typ I Allels für ROP18 in einen Typ III avirulenten Stamm erhöht die Virulenz des Letzteren um mehr als das Vierfache (Taylor et al., 2006). Weitere erfolgreiche Mechanismen der Immunevasion von *T. gondii* basieren auf der Inhibition der Hochregulation von MHC I Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen und auf der Herabsetzung der Gen-Expression von MHC II Molekülen, wobei der Parasit die durch IFN- $\gamma$  stimulierte STAT1 Translokation in den Zellkern verhindert (Luder et al., 1998; Luder et al., 2001). Das hat eine reduzierte Antigenpräsentation an T-Lymphozyten zur Folge (Luder et al., 1998). Außerdem begünstigt die Reduktion der Expression von iNOS in infizierten M $\Phi$  die parasitäre Replikation (Luder et al., 2003).

Eine *T. gondii* Infektion kann sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken (Mordue et al., 2001; Carmen et al., 2006; Laliberte and Carruthers, 2008). Einer der anti-apoptotischen Mechanismen ist die Inhibition der Cytochrom C vermittelten Aktivierung von Caspase-3 über die Hochregulation von heat shock protein 70 (HSP70) und von Bcl2 in infizierten M $\Phi$  (Nash et al., 1998; Goebel et al., 2001; Molestina et al., 2003; Hwang et al., 2010). Außerdem wirkt HSP27 der Entstehung des Apoptosoms und der Aktivierung von Caspasen entgegen (Garrido et al., 2003). Pro-apoptotische Mitglieder der Bcl2 Familie Bad und Bax werden hingegen selektiv degradiert (Carmen et al., 2006; Nelson et al., 2008). Darüber hinaus verhindern *T. gondii* Typ I Stämme in murinen Fibroblasten sowie Typ II Stämme in Splenozyten und M $\Phi$  den programmierten Zelltod über die NF- $\kappa$ B abhängige Expression anti-apoptotischer Gene (Payne et al., 2003; Robben et al., 2004; Sinai et al., 2004; Molestina and Sinai, 2005b). Der Verlust einer der NF- $\kappa$ B Untereinheiten führt zur erhöhten Suszeptibilität des Wirts während der akuten und chronischen Infektionsphasen (Caamano et al., 1999). Dagegen verzögern Toxoplasmen der Typ I Stämme den Zellkerntransport von NF- $\kappa$ B in murinen M $\Phi$  und humanen Fibroblasten trotz der Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  durch eine parasitäre

PVM gebundene Kinase (Butcher et al., 2001; Molestina et al., 2003; Molestina and Sinai, 2005a), wodurch die Expression von IL-12p40 und TNF- $\alpha$  reduziert wird (Kim et al., 2004; Shapira et al., 2005). Dies Phänomen könnte eine Abwehrstrategie des Parasiten darstellen, um die Initiation der pro-inflammatorischen Antwort in M $\Phi$  zeitlich hinauszuschieben, wodurch dem Parasiten ermöglicht wird sich in der Wirtszelle zu etablieren. Außerdem induzieren Typ I Stämme Apoptose der benachbarten, nicht infizierten Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation über die Aktivierung der Expression der iNOS und die Sekretion von NO (Nishikawa et al., 2007). *T. gondii* aktiviert die Transkription pro-parasitischer Gene wie der für Enzyme der Glykolyse, für den Transferrin Rezeptor und den epithelialen Wachstumsfaktor durch die Regulation des wirtseigenen Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (HIF1) (Zinkernagel et al., 2007). Aber auch andere in Wachstums- und Überlebens-Prozesse der Wirtszelle involvierte Gene, wie die für Untereinheiten der EGR und AP-1 Transkriptionsfaktoren, werden durch die Infektion hochreguliert (Molestina and Sinai, 2005b; Phelps et al., 2008). Diese Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle bei zellulären Stressantworten, unter anderem während Infektionen (Huang et al., 1996).

Anti-*Toxoplasma* Immunantworten werden an zwei distinkten Zeitpunkten generiert; während der erstmaligen akuten Infektion und während der Reaktivierung der Infektion nach Ausbruch aus der Zyste. In beiden Fällen reagiert das Immunsystem des Wirts mit der Freisetzung von IL-12 aus DCs, M $\Phi$  und neutrophilen Granulozyten, welches die Sekretion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aus T- und NK-Zellen stimuliert (Gazzinelli et al., 1993; Scharton-Kersten et al., 1996; Reis e Sousa et al., 1997; Suzuki, 2002). Die Infektion von IL-12 defizienten (IL-12<sup>-/-</sup>) Mäusen bzw. die systemische Depletion von IL-12 in infizierten WT Mäusen führt zu einer 100% Mortalität nach einer *T. gondii* Infektion der Tiere (Gazzinelli et al., 1994; Yap et al., 2000). In beiden Untersuchungen hatte der Mangel von IL-12 eine deutlich reduzierte IFN- $\gamma$  Expression zur Folge. Die IL-12 Expression wird von *T. gondii* sowohl durch die Stimulation des Cystein-Cystein Chemokin-Rezeptors 5 (CCR5) durch Cyclophilin-18 (C-18), wie auch durch die Aktivierung der TLR-abhängigen Signalwege in DCs und M $\Phi$  induziert (Scanga et al., 2002; Aliberti et al., 2003, Abb. 1.16). Mehrere TLRs binden *T. gondii* assoziierte Faktoren, darunter TLR2 und TLR4, die durch dominante Oberflächenglycolipide wie GPIs oder HSP70 von *T. gondii* aktiviert werden (Mun et al., 2005; Debierre-Grockiego et al., 2007). TLR9, der Sensor für genomische DNS, wird durch die DNS mit CpG Motiven aktiviert (Minns et al., 2006), und an TLR11 in Mäusen bindet das parasitäre Aktin-

bindende Strukturprotein Prophilin (Gazzinelli et al., 2004; Yarovinsky et al., 2005). TLRs sind kritisch für mehrere Aspekte der Wirt-Parasit-Interaktionen, darunter für die Initiation der pro-inflammatorischen Zytokin-Antwort und die Expression von kostimulierenden Molekülen (Pifer and Yarovinsky, 2011). Jüngste Studien belegen jedoch, dass vor allem das Adapterprotein MyD88 in DCs für die IL-12 stimulierte IFN- $\gamma$  Antwort während der Infektion mit Typ I Stamm von *T. gondii* verantwortlich ist (Scanga et al., 2002; Hou et al., 2011). Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle von DCs bei der angeborenen Immunantwort und bei der Entwicklung der CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 vermittelten Resistenz gegen *T. gondii* (Gazzinelli and Denkers, 2006). Zusätzlich werden während der Infektion weitere Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-18 induziert, deren Rezeptoren ebenfalls mit MyD88 interagieren (Hunter et al., 1995; Cai et al., 2000; Mordue et al., 2001). Diese Zytokine verstärken die IL-12-vermittelte Resistenz gegen den Typ II ME49 *T. gondii* Stamm.

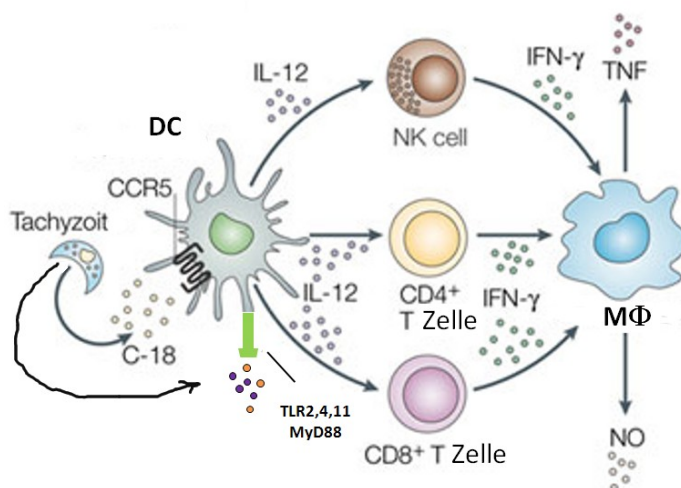
IFN- $\gamma$  ist einer der kritischen Mediatoren der Wirtsresistenz bei akuten und chronischen *T. gondii* Infektionen (Suzuki et al., 1988; Denkers and Gazzinelli, 1998; Yap and Sher, 1999; Denkers and Butcher, 2005). IFN- $\gamma$  induzierte Effektormoleküle wie iNOS (Scharton-Kersten et al., 1997), reaktive Sauerstoffmetabolite in phagozytischen Zellen (Boehm et al., 1997),IDO (Pfefferkorn, 1984), p47 Familie der GTPasen in Mäusen (Collazo et al., 2001) und die Familie der GBPs (Degrandi et al., 2007) erscheinen wichtig für die *T. gondii*-Resistenz. Ihre Wirkmechanismen auf den Parasiten sind jedoch sehr verschieden und nur zum Teil verstanden. Durch NO $\cdot$  wird die Proliferation von *T. gondii* gehemmt (Adams et al., 1990). iNOS<sup>-/-</sup> Mäuse können die Parasitenreplikation in der akuten Phase kontrollieren, während sie in der chronischen Phase hochsuszeptibel sind und an einer *Toxoplasma*-Encephalitis sterben (Scharton-Kersten et al., 1997). Die IDO reduziert die Menge an essentiellm Tryptophan und hemmt dadurch die Proliferation intrazellulärer Pathogene (Pfefferkorn, 1984; Daubener et al., 2001). Die p47 GTPasen spielen eine zentrale Rolle bei der IFN- $\gamma$ -induzierten Hemmung von Toxoplasmen in murinen Astrozyten (Halonen et al., 2001). Die GTPasen sind an der Zerstörung der PV der avirulenten *T. gondii* Stämme (Martens et al., 2005) und an der Stimulierung der Autophagie in murinen Zellen (Ling et al., 2006) beteiligt und sind vermutlich in die Prozessierung immunologisch relevanter Moleküle involviert (Tiwari et al., 2009). Die Rolle der GBPs bei der *T. gondii* Infektion ist noch nicht vollständig geklärt. Mehrere GBPs rekrutieren zur PVM des Typ II ME49 Stammes, jedoch nicht zur PV des Typ I BK Stammes (Degrandi et al., 2007). Die Deletion eines Mitglieds dieser Familie in Mäusen



(mGBP2) führt bei einer Infektion mit dem ME49 Stamm zu einer erhöhten Mortalität und Morbidität der Mäuse *in vivo* (Degrandi et al., 2012, eingereicht). Es existiert nur ein Vertreter der p47 GTPasen im Menschen (MacMicking, 2004), der in die Autophagie involviert ist (Singh et al., 2010). Ob dieses Protein eine Rolle im Zusammenhang mit der *T. gondii* Infektion spielt, wurde noch nicht untersucht.

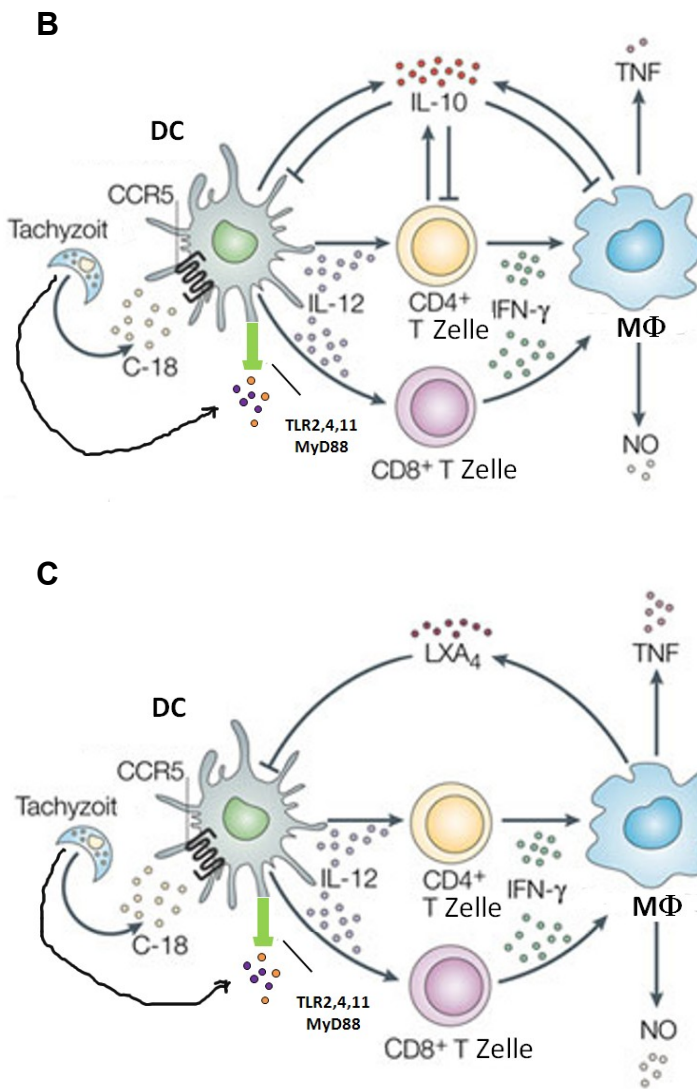
*T. gondii* hat allerdings Wege gefunden die IFN- $\gamma$  induzierte Immunität zu antagonisieren (Lang et al., 2007). *T. gondii* infizierte Zellen sind deutlich weniger responsiv gegenüber IFN- $\gamma$ , was sich in den verminderten Expressionsniveaus von MHC II, iNOS und p47 GTPasen äußert (Luder et al., 2001; Kim et al., 2007). *T. gondii* inhibiert die STAT1-vermittelte Transkription in IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen über die Induktion von SOCS Proteinen (Zimmermann et al., 2006), die sowohl die katalytische Aktivität von JAKs hemmen als auch die Rekrutierung von STAT1 verhindern (Murray, 2007). Die Beobachtung, dass das STAT1 Proteinniveau in *T. gondii* infizierten M $\Phi$  erniedrigt ist (Zimmermann et al., 2006), ist übereinstimmend mit der bekannten Funktion der SOCS Proteine, STAT1 Moleküle für die proteosomale Degradation zu markieren. Andere Studien lassen auf eine Inhibition der STAT1 Bindung an die GAS der Promotoren von STAT1 responsiven Genen durch *T. gondii* schließen (Lang et al., 2006). Der überschießenden Produktion von IL-12 wird bei einer Infektion in der späten akuten Phase durch die Induktion von IL-10 in M $\Phi$  und T<sub>H</sub>1 Zellen (Gazzinelli et al., 1996; Jankovic et al., 2007) und durch die Expression von Lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) in der chronischen Phase (Aliberti et al., 2002) entgegengewirkt, um eine pro-inflammatorische Pathologie und Gewebeschäden zu verhindern und um die Etablierung einer chronischen Infektion zu favorisieren (Aliberti, 2005, Abb. 1.17).

**A**



**Abb. 1.17: Kontrolle der pro-inflammatorischen Antworten während einer *T. gondii* Infektion.**

Kurz nach der Infektion sekretiert *T. gondii* Faktoren wie den CCR5 Liganden C-18 sowie TLR-Agonisten. Die Rezeptoraktivierung resultiert in der Produktion von IL-12 in DCs. Die IL-12 Produktion induziert oder favorisiert die Differenzierung/Proliferation der CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 und CD8<sup>+</sup> T und NK Zellen, die IFN- $\gamma$  produzieren. IFN- $\gamma$  aktiviert Wirtszellen, unter anderem M $\Phi$ , die mikrobizide Faktoren, wie NO oder TNF- $\alpha$  produzieren (A).



Während der späten akuten Phase wird der potentielle zytotoxische Effekt durch die Produktion von IL-10 an Orten der starken Toxoplasmen-Replikation, wie der Leber oder der Milz, kontrolliert. IL-10 reguliert die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, sowie die mikrobizide Aktivität in DCs, T-Zellen, NK-Zellen und MΦ herunter (B). Während der chronischen Infektionsphase wird Lipoxin (LXA<sub>4</sub>) produziert, das die proinflammatorische Zytokinantwort an Orten wie das ZNS kontrolliert, ohne die mikrobizide Kapazität von MΦ zu beeinträchtigen (C). Nach (Aliberti, 2005).

Obwohl *T. gondii* vor über 100 Jahren entdeckt worden ist (Ferguson, 2009) beginnt man erst jetzt die Mechanismen dieses Parasiten zu begreifen, mit denen er den Wirt moduliert, um Virulenz, Wachstum, Immunevasion und Bradyzoiten-Entwicklung zu ermöglichen. Es bleiben jedoch noch viele Fragen offen. Ein weitgestecktes Ziel bleibt die Entwicklung von schützenden Vakzinen und das Finden von neuen antiparasitären Targetstrukturen. Das Verständnis der grundlegenden biologischen Prozesse und der molekularen Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktionen werden helfen, dieses Ziel zu erreichen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

In vorangehenden Arbeiten konnte mit Hilfe von Transkriptom-Array Analysen die Familie der p65 GBPs als neue, durch IFN- $\gamma$  stark hochregulierte Gene in murinen ANA-1 Makrophagen identifiziert werden (Degrandi et al., 2007). In verschiedenen Organen *T. gondii* infizierter Mäuse wurde eine deutliche Induktion der GTPasen mGBP1, 2, 3 und 5 nachgewiesen (Degrandi et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass mGBP2 defiziente Mäuse anfälliger als Kontroll-Mäuse gegenüber Infektionen mit *T. gondii* waren (Dissertation C. Konermann, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die biochemischen Eigenschaften von mGBP2 analysiert werden. Die Untersuchung der Affinität der Nukleotidbindung sollte Rückschlüsse auf den Nukleotidbindezustand unter zellulären Bedingungen ermöglichen. Die Kinetik der GTP-Hydrolyse wurde mit dem Ziel analysiert, die Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte und die dabei auftretenden Intermediate zu identifizieren. Die Herstellung und biochemische Charakterisierung von gezielten Punktmutanten in der N-terminalen GTPase-Domäne, sowie an der C-terminalen Isoprenylierungsstelle sollte die Rolle konservierter Aminosäuren des Proteins bei den einzelnen Schritten des GTP-Reaktionszyklus zeigen und die Aufklärung der Mechanismen der Hydrolyse von GTP durch mGBP2 ermöglichen.

Die biochemische Charakterisierung der GTPase-Mutanten sollte die Ausgangsbasis für zellbiologische Experimente schaffen. Außerdem sollten Deletionsmutanten verschiedener Domänen hergestellt werden, um die biologische Funktion der einzelnen Regionen von mGBP2 aufzuklären. Zunächst sollte die subzelluläre Lokalisation der rekonstituierten Proteinmutanten in mGBP2 defizienten murinen embryonalen Fibroblasten mikroskopisch und mit Hilfe diverser Fraktionierungsmethoden bestimmt werden. Weiterhin sollte die Effektorfunktion von mGBP2 als Teil der zellulären Immunantwort bei der *T. gondii* Infektion verifiziert und Strukturelemente des Proteins identifiziert werden, die für die anti-mikrobielle Wirkung verantwortlich sind. Diese Experimente sollten auch die Interpretation der Daten erleichtern, die mit verwandten Proteinen erhalten wurden, deren Biochemie bisher nicht im gleichen Maße untersucht wurde. Schließlich sollten im Rahmen dieser Arbeit Interaktionspartner von mGBP2 innerhalb der mGBP Familie mittels Immunpräzipitation identifiziert werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hamburg
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz: <i>E. coli</i>	Roth, Karlsruhe
Bactoagar	BD Biosciences, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol: Zellkultur	Invitrogen, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol: Proteinaufreinigung	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin), frei von Fettsäuren	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie R-250, G-250	Merck, Darmstadt
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Molecular Probes, USA
Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Gibco, Eggenstein
DMSO	GE Healthcare, München
ECL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	BD Biosciences, Heidelberg
FKS (Fötale Kälberserum)	Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ, USA
FKS (Fötale Kälberserum) low Endotoxin	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Fluoromount-G	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Jena Bioscience, Jena
GDP (Guanosin-5'-diphosphat)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GMP (Guanosin-5'-monophosphat)	

GppNHp (Guanosin-5'-[(β,γ)-imido]-triphosphat)	Jena Bioscience, Jena
GTP (Guanosin-5'-triphosphat)	Fluka, Taufkirchen
GTPγS (Guanosin-5'-(γ-thio)-imido]-triphosphat)	Jena Bioscience, Jena
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Gibco, Karlsruhe
IFN-γ, murin	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IMDM Medium	BioWhittaker, Lonza, Belgien
Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
mant-GDP (2'/3'-O-(N'-Methyl-anthraniloyl)- guanosin-5'-diphosphat)	Jena Bioscience, Jena
mant-GMP (2'/3'-O-(N'-Methyl-anthraniloyl)- guanosin-5'-monophosphat)	Biolog Life Science Institute, Bremen
mant-GppNHp (2'/3'-O-(N'-Methyl- anthraniloyl)-guanosin-5'-[(β,γ)-imido]- triphosphat)	Jena Bioscience, Jena
mant-GTP (2'/3'-O-(N'-Methyl-anthraniloyl)- guanosin-5'-triphosphat)	Jena Bioscience, Jena
mant-GTPγS (2'/3'-O-(N'-Methyl- anthraniloyl)-guanosin-5'-(γ-thio)-imido]- triphosphat)	Jena Bioscience, Jena
MassRuler™ DNS-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Murines IFN-γ	R&D Systems, Mainz
Milchpulver	Oxoid, Hampshire, England
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
NKS (Neugeborenes Kälberserum)	Gibco, Karlsruhe

---

NP-40 (IGEPAL CA-630®)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)- benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid)	Roche, Mannheim
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roche, Mannheim
Polybren	Millipore, Schwalbach
Proteinmarker, High-Range Rainbow	GE Healthcare, München
Proteinmarker, PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-G-Sepharose	GE Healthcare, München
Re-Blot Plus Strong Solution	Millipore, Schwalbach
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Saponin	Calbiochem-Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TE-MED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Merck, Darmstadt
Tetrabutylammoniumbromid	Merck, Darmstadt
Transfektionsreagenz:	
Jet PEI™	Polyplus, Berkeley, CA, USA
Turbofect	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lipofectamine2000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween-20	Merck, Darmstadt
Trypton/Pepton	Invitrogen, Karlsruhe
Ultrapure H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Ziegen Serum	DaKoCytomation, Hamburg

## 2.1.2 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-β-Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Caspase-3	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Anti-Calreticulin	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Anti-CD29	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-FLAG® M2 monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-FLAG® M2-Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-GFP	Roche, Mannheim
Anti-GM130	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-HA monoklonal	Roche, Mannheim
Anti-HA monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-HA polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Lamp1	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-LC3 (2G6)	NanoTools, Teningen
Anti-LC3 A/B	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Anti-mGBP1.2 (RQEIEKIKNMPPPRSC)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP2 (EVNGKPVTSDYEYLEHC)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP3.2 (CLREEMERTRRKPSLF)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP5.2 (CEQLKANYRQQPGKGTQA)	Eurogentec, Belgien
Anti-NaK-ATPase	Enogene Biotech, NY, USA
Anti-p70 S2	Cell Signaling Technology, Boston, USA
Anti-p62	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PARP	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-PMP70	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Rab7	Abcam, Cambridge, UK
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> [TP3] (SAG1)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Syntaxin6	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Tom-20	Santa Cruz, USA
Anti-Vimentin	Santa Cruz, USA
Cy <sup>TM</sup> 2 Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy <sup>TM</sup> 2 Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy <sup>TM</sup> 3 Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy <sup>TM</sup> 3 Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Cy <sup>TM</sup> 3 Goat Anti-Rat IgG + IgM	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Goat Anti-Mouse POX	Dianova, Hamburg
Goat Anti-Rabbit IgG POX	BD Biosciences, Heidelberg



### 2.1.3 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
DNS Polymerase, High Fidelity	Roche, Mannheim
DNS Polymerase, Expand High Fidelity	Roche, Mannheim
DNS Polymerase, Native <i>PfuTurbo</i>	Stratagene, Texas, USA
DNS Polymerase, Native Pfx	Invitrogen
DNS T4 Ligase	NEB, Frankfurt a. M.
DNS Ligations-Mix	TaKaRa, Shiga, Japan
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Frankfurt a. M. Roche, Mannheim MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	USB, High Wycombe, UK

### 2.1.4 Radiochemikalien

[5,6-H<sup>3</sup>] Uracil

Das Reagenz wurde von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) bezogen und in einer Konzentration von 1:10 eingesetzt (0,037 MBq/well (96)).

### 2.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenz	Bezugsquelle
ANTI-FLAG® M2 Affinity Agarose Gel monoklonal	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Anti-HA-Agarose HA-7 monoklonal	Sigma Aldrich, Taufkirchen
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL
Bis-Tris SDS-Gele (4-12%)	Invitrogen, Karlsruhe
Deckgläschen: Microscope Coverslips	VWR, Darmstadt
Filme: Hyperfilm™-ECL	GE Healthcare, München
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Dassel
Kanülen	BD Pharma, Heidelberg
Küvetten	Brand, Wertheim
Membrane Lipid Strips™	Echelon, Salt Lake City, USA
Native Bis-Tris Gele NativePAGE™ (4-16%)	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrocellulose Membran Protan BA85	Whatman, Dassel
Plasmid-Isolierungskit: Maxi-Prep	Macherey-Nagel, Düren
Objektträger	VWR, Darmstadt
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
PCR-Gelextraktionskit	Zymo Research, Freiburg Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Plastikwaren	Biozym Scientific GmbH, NUNC, Wiesbaden BD Falcon, Heidelberg Eppendorf, Hamburg
Plasmid Isolierungskit ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit	Macherey-Nagel, Düren Calbiochem-Merck, Darmstadt
qPCR MasterMix No ROX	Eurogentec, Liege, Belgien
Quik-Change II Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Californien
Rotiphorese® Gel 30% Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Spritzen	Omnifix, Melsungen
TOPO TA Cloning® Kit 2.1	Invitrogen, Karlsruhe
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld

## 2.2 Geräte

Gerät/Bezeichnung	Hersteller
Abzug	wrt-Laborbau, Stadtlohn
Analysenwaage, Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Analysenwaage ABT 120 5 DH	Kern, Buchholz
Brutschrank, BBD6220: Eukaryotische Zellen	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank: Bakterienplatten: function line	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank: <i>E. coli</i> Kulturen Ecotron, Multitron Standard	Heraeus Instruments, Hanau
Cell Density Meter Ultraspec 10	Amersham Bioscience
Constant Cell Disruption Systems TC Series Kühlung: Neslab RTE 740	Constant Systems Ltd, USA Thermo Scientific, Geel, Belgium
Counter, 120S Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Digitalkamera, Powershot G2	Canon, Amsterdam, Niederlande
Elektrophoresekammer für DNS	Hoefer, Amstetten
Elektrophoresekammer für NuPAGE Gele: X sure Lock	Invitrogen, Karlsruhe
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln
Fluoreszenzspektrometer	
Fluorolog	HORIBA Jobin Yvon, Bensheim
Fluoreszenzküvetten QS 10.00	Starna, Pfungstadt
Küvettentrockner	Abbott Diagnostics, Wiesbaden
Wasserbad: Thermo Digital Plus	Thermo Scientific, Rockford, USA
FPLC Säulen	GE Healthcare, München
Säule für Ni-NTA Agarose	
Hi Load 26/60 Superdex 200	

---

Superdex 200 10/300 GL	
FPLC Systeme: ÄKTA	GE Healthcare, München
Micro, Explorer, Prime, Basic, Purifier	
Box 900	
P 905	
pH/C 900	
UV 900	
Unicorn manager	
Gefrierschrank -80°C Ultra Low	Sanyo, San Diego, CA , USA
Geldokumentationssystem, BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
Geldokumentationssystem	Bio-Rad, München
Heizofen, OV3	Biometra, Göttingen
Harvester, Basic 96	Satron instruments, Tampere, Finnland
 HPLC	
Lampe: Interface 35900E	Agilent Technologies, Böblingen
Programm: EZ Chrom Elite	Agilent Technologies, Böblingen
Pumpe: Intelligent Pump L-6200A	Merck-Hitachi, Darmstadt
Säule: RP-C18	Supelco, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
UV Detektor: L-7400 LaChrom	Merck-Hitachi, Darmstadt
Kühlzentrifugen: Eukaryotische Zellen	
Sorvall® RC26 PLUS	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Konfokalmikroskop, LSM510 Meta	Zeiss, Oberkochen
LSM780	
Magnetrührer: MR3001 K	Heidolph, Schwabach
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Mikroskope	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 25	
NanoDrop	Thermo Scientific, Rockford, USA
TE2000	Nikon, Düsseldorf
Milli-Q	Millipore, Consett, UK
PCR-Geräte	Biometra, Göttingen
T1 Thermocycler,	
T3 Thermocycler,	
T-Gradient	
Realtime-PCR Maschine, iCycler IQ5	Bio-Rad, München
pH-Meter (MP225)	Mettler Toledo, Giessen
Photometer, GeneQuant II	Pharmacia, Braunschweig
Pipetten	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pipettierhilfe (Pipet-Boy, accu-jet)	Brand, Wertheim
Proteintransfer-Apparatur (Transblot SD)	Bio-Rad, München
Schüttler für Bakterienkulturen	Infors HT, Schweiz
Ecotron	

---

---

Multitron Standard	
Spannungsquellen	
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
PS 500 XT	HIS, San Francisco, USA
Sterilbank, HLB 2472 GS	Heraeus, Hanau
SDS-PAGE Gelsystem für Biochemie	Bio-Rad, München
Thermoblöcke, Termomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415 C, miniSpin	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Ultra-TURRAX®	IKA-Werke, Staufen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Waage Precisa 600	Oehmen, Essen
Waage EMB 2200-0	Kern, Buchholz
Wasserbad WNB22	Memmert, Schwabach
2-Winkel-Lichtstreuung	
Optilab Rex Eclipse AF4	Wyatt Technology, Dernbach
Zellkulturschüttler, 3015	GFL, Burgwedel
Zuckergradientsystem	
FPLC: Liquid Chromatography Controller	GE Healthcare (Amersham),
LCC500 plus	Pharmacia Biotech, München
Pumpe p-500	
Mixer 24V 50-60 Hz	
Peristaltikpumpe: Pumpdrive 5101	Heidolph, Schwabach
Fraktionssammler: RediFrac	GE Healthcare Pharmacia Biotech, München
Zentrifugen und Rotoren: Bakterien	
Evolution RC Centrifuge Sorvall®	Thermo Scientific, Rockford, USA
F8S-6x1000y FIBERlite Centrifuge	Piramoontechnologies Inc., Thermo Scientific, Rockford, USA
Optima™ L90K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Type 45Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Type 60Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Type 70Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Sorvall Discovery™ 90 SE Hitachi	Thermo Scientific, Rockford, USA
S100 AT 6	Thermo Scientific, Rockford, USA
S120 AT 3	Thermo Scientific, Rockford, USA
Sorvall Discovery™ M120 SE Hitachi	Thermo Scientific, Rockford, USA
TST 41.14	Kontron, Eching/München
SW41Ti	Beckman, Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge L60	Beckman, Coulter, Krefeld
SW55Ti	Beckman, Coulter, Krefeld
Zirkulardichroismus	
Optilab Rex Eclipse AF4	Wyatt Technology, Dernbach

---

## 2.3 Medien und Puffer

### 2.3.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Medien/Zusätze	Bezugsquelle
β-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)	Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS),	PAN Biotech, Aidenbach
Neugeborenes Kälberserum (NKS)	Gibco, Karlsruhe
Hank's Buffered Saline Solution (HBSS)	PAN Biotech, Aidenbach
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	Gibco, Karlsruhe
1640 Medium - L-Glutamin	
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe

### 2.3.2 Stammlösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Ampicillin Stammlösung	100 mg/mL	in ddH <sub>2</sub> O
Blockierlösung für Immunfluoreszenz	2%	Ziegenserum in 10% Permeabilisierungslösung
Chloramphenicol Stammlösung	30 mg/mL	in Ethanol
Coomassie-Blue R-250 für Kontrollgele	0,1% 40% 10%	Brilliantblau R-250, Merck Methanol Eisessig
Coomassie-Blue G-250 für Massenspektrometrie (MS)	0,02% 2% (w/v) 10% 5%	Brilliantblau G-250, Merck Phosphorsäure Ethanol Aluminiumsulfat (Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> )
DAPI Lösung	1:2500	in PBS
5 x DNS Auftragspuffer	15% 0,05% 0,05%	Ficoll Typ 400 Bromphenolblau Xylencyanol
10 x DNS Auftragspuffer	1 mg/mL 10 mM	Orange G Tris/HCl, pH 7,5

	30%	Gelatine
dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dGTP
	1 mM	dTTP
Entfärbelösung für R-250	40%	Methanol
Coomassie Kontrollgele	10%	Eisessig
Entfärbelösung für G-250	2% (w/v)	Phosphorsäure
Coomassie Gele für MS	10%	Ethanol
Fixierlösung für G-250 Coomassie	2% (w/v)	Phosphorsäure
Gele für MS	30%	Ethanol
Fixierlösung für Zellen für Immunfluoreszenz	4%	PFA in PBS
HEBS (2 x)	0,28 M	NaCl
	0,05 M	HEPES
	1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		pH 7,0
Homogenisierungspuffer für die Zuckergradienten-Zentrifugation	0,8 M	Sukrose
	20 mM	Tris/HCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	140 mM	NaCl
	1	Protease-Inhibitor Cocktail- Tablette pro 10 mL auflösen (EDTA frei) (Roche)
	1	PhosSTOP Tablette pro 10 mL auflösen (Roche)
	5 mM	NaF
	2,5 mM	PMSF
		pH 7,9
HPLC-Lösung	10 mM	Tetrabutylammoniumbromid
	0,2 mM	NaN <sub>3</sub>
	100 mM	Kaliumphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
	2%	Acetonitril
HPLC-Spüllösung	20%	Acetonitril

Hypotonischer Lysepuffer für Lipidassay	20 mM	Tris/HCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1	Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen (EDTA frei) (Roche)
	1	PhosSTOP Tablette pro 10 mL auflösen (Roche)
10 x PCR Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,3
	15, 20, 25 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,1%	Gelatine
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Permeabilisierungslösung	0,02%	Saponin in PBS
Puffer A ( <i>E. coli</i> Lysepuffer und Hochsalz-Waschpuffer für Ni-NTA)	50 mM	Tris/HCl
	300 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	Imidazol
	10 mM	β-Mercaptoethanol pH 8,0
Puffer B (Niedrigsalz-Waschpuffer für Ni-NTA)	50 mM	Tris/HCl
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	Imidazol
	10 mM	β-Mercaptoethanol pH 8,0
Puffer C (Elutionspuffer für Ni-NTA)	50 mM	Tris/HCl
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	300 mM	Imidazol
	10 mM	β-Mercaptoethanol pH 8,0
Puffer D (Gelfiltrationspuffer)	50 mM	Tris/HCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2 mM	DTT

		pH 8,0
Sammelgel (5%)	0,7 mL	Rothiphorese® 30
	0,8 mL	Sammelgelpuffer
	3,5 mL	ddH <sub>2</sub> O
	5 µL	TEMED
	50 µL	APS
Sammelgelpuffer	0,4%	SDS
	0,5 M	Tris/HCl
		pH 8,85
50 x TAE	2 M	Tris/HCl
	1 M	Eisessig
	0,1 M	EDTA
		pH 8,0
TAE (Elektrophoresepuffer, DNS)	40 mM	Tris/HCl
	20 mM	Eisessig
	2 mM	EDTA
		pH 8,0
TBS-T	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl
	0,1%	Tween-20
		pH 7,6
TE Puffer	10 mM	Tris/HCl
	1 mM	EDTA
		pH 8,0
Trenngel (10%)	2,5 mL	Rothiphorese® 30
	2,5 mL	Trenngelpuffer
	4,8 mL	ddH <sub>2</sub> O
	5 µL	TEMED
	100 µL	APS
Trenngelpuffer	0,4%	SDS
	1,5 M	Tris/HCl
		pH 8,85
WB Auftragspuffer (5 x) für Invitrogen-Gele	45%	Glycerin
	25%	β-Mercaptoethanol
	10%	SDS



	0,15%	Bromphenolblau
	30 mM	Tris/HCl pH 6,8
WB Auftragspuffer (5 x) für Bio-Rad-Gele	45%	Glycerin
	6 M	Urea
	3,2%	SDS
	0,2%	Bromphenolblau
	30 mM	Tris/HCl pH 6,8
WB Lysepuffer	140 mM	NaCl
	20 mM	Tris/HCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1%	NP-40
	1	Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen (EDTA frei) (Roche)
	1	PhosSTOP Tablette pro 10 mL auflösen (Roche)
	5 mM	NaF
	2,5 mM	PMSF pH 7,6
WB/IP Lysepuffer	PBS	
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1%	NP-40
	1	Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen (EDTA frei) (Roche)
	1	PhosSTOP Tablette pro 10 mL auflösen
WB Laufpuffer (20 x) Invitrogen-SDS-Gele	50 mM	MOPS
	50 mM	Tris Base
	1 mM	EDTA
	0,1% (w/v)	SDS pH 7,7
WB Laufpuffer (10 x) Bio-Rad-Gele	50 mM	Tris/HCl
	196 mM	Glycin
	1,8 mM	EDTA
	0,1% (w/v)	SDS pH 8,3

WB Laufpuffer (1 x) Invitrogen-native Gele	15,5 mM	Tris/HCl
	0,025%	Bromphenolblau
	7 mL	ddH <sub>2</sub> O
	25 mL	Glycerin pH 6,8
WB Transferpuffer	25 mM	Bicine
	25 mM	Bis/Tris
	1 mM	EDTA
	20%	Methanol
Zuckergradientenlösung 0,8 M	0,8 M	Sukrose
	20 mM	Tris/HCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	140 mM	NaCl
	1	Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen (EDTA frei) (Roche)
	1	PhosSTOP Tablette pro 10 mL auflösen (Roche)
	5 mM	NaF
	2,5 mM	PMSF pH 7,9
Zuckergradientenlösung 2 M	2 M	Sukrose
	20 mM	Tris/HCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	140 mM	NaCl
	1	Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen (EDTA frei) (Roche)
	1	PhosSTOP Tablette pro 10 mL auflösen (Roche)
	5 mM	NaF
	2,5 mM	PMSF pH 7,9

### 2.3.3 Medien für die Zellkultur

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Zelltyp	Grundmedium	FKS*	Penicillin	Streptomycin	$\beta$ -ME	L-Glutamin
EF Zellen	DMEM hohe Glukose	10%	100 U/mL	100 $\mu$ g/mL	0,05 mM	2 mM
HS27/HFF Fibroblasten	IMDM	10%	100 U/mL	100 $\mu$ g/mL	0,05 mM	2 mM
NIH 3T3 Zellen	DMEM hohe Glukose	10% NKS	100 U/mL	100 $\mu$ g/mL	0,05 mM	2 mM
293 FT Zellen	DMEM hohe Glukose	10%	100 U/mL	100 $\mu$ g/mL		2 mM

\* für murine embryonale Fibroblasten getestetes FKS, für NIH 3T3 Zellen getestetes NKS, 1 h bei 56°C deaktiviert.

### 2.3.4 Medien für die Bakterienkultur

Die Medien (Tab. 2.2) wurden durch Autoklavieren (121°C / 2 bar / 20 min) sterilisiert. Um Festmedium zu erhalten, wurden dem Medium 15 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren zugesetzt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Bakterien auf Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4°C maximal 4 Wochen aufbewahrt. Zur Langzeitkonservierung wurden über Nacht gewachsene Flüssigkulturen 1:1 mit 98% sterilem Glycerin vermischt und bei -80°C oder im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Bakterienkulturmediums.

Medium	Zusammensetzung	Menge
LB	Trypton/Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
	pH 7,2	

## 2.4 Antibiotika

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Kulturmedium je nach verwendetem Plasmid Ampicillin allein oder eine Ampicillin/Chloramphenicol Mischung beigefügt (Tab. 2.3).

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotika.

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert	100 µg/mL
Chloramphenicol	30 mg/mL in EtOH, sterilfiltriert	30 µg/mL

## 2.5 Bakterienstämme und Zelllinien

### 2.5.1 Bakterien- und Toxoplasmenstämme

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Toxoplasmenstämme unter Angabe des Genotyps und der Referenz aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Bakterien- und Toxoplasmenstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17( <i>rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup></i> ) λ <sup>-</sup>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> Rosetta™	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (R <sub>B<sup>-</sup></sub> m <sub>B<sup>-</sup></sub> ) gal dcm λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> )	Novagen®, USA
<i>T. gondii</i> ME49, Typ II	obligat intrazellulär replizierender Einzeller	(Parmley et al., 1994)

### 2.5.2 Zelllinien

In Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zellen unter Angabe der Eigenschaften und der Referenz aufgelistet.

**Tabelle 2.5: Verwendete Zellen.**

Zellen	Eigenschaften	Referenz
EF Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus C57BL/6 Embryonen	frisch isoliert (Klein et al., 1993)
293FT Zellen	humane primäre embryonale Nierenzelllinie transformiert mit humanem Adenovirus Type 5 DNS, zusätzlich mit pCMVSPORT6Tag.neo transformiert	Invitrogen (Graham et al., 1977)
HS27/HFF	humane Vorhaut Fibroblasten	ATCC, CRL-1634™
mGBP2 <sup>-/-</sup> EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus mGBP2 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Embryonen	frisch isoliert, (Dissertation C. Konermann, 2008)
NIH 3T3	murine embryonale Fibroblasten Zelllinie	ATCC, CRL-1658™

## 2.6 Primer

Die in diesem Kapitel aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert, gereinigt und lyophilisiert. In Tabellen 2.6 und 2.7 sind alle Primer aufgeführt, die zur Klonierung von GFP-mGBP2-WT und trunkierten Fusionskonstrukten verwendet wurden.

**Tabelle 2.6: Primer zur Klonierung von GFP-Fusionskonstrukten für GFP-mGBP2-WT.**

Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pEGFP-C2- mGBP2_fwd	ATT GGA AGA TCT CGG CCT CAG AGA TCC ACA TGT CG	pEGFP-mGBP2 Fusionskonstrukt
pEGFP-C2- mGBP2_rev	ATT AAC GGG GTA CCG GAG TAT AGT GCA CTT CCC AGA CG	pEGFP-mGBP2 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-w/o-STOP_fwd	ATT GGA TCC AGG CCT AAG CTT ACG	pWPXL-GFP Ausgangskonstrukt
pWPXL-GFP-w/o-STOP_rev	ATT GAA TTC GAA GTT GAG CTC AGA TCT GAG TCC GGA C	pWPXL-GFP Ausgangskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2_fwd	ATA TCC CGG GAG CCT CAG AGA TCC ACA TGT CG	pWPXL-GFP-mGBP2 Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2_rev	ATA TCA TAT GTC AGA GTA TAG TGC ACT TCC CAG	pWPXL-GFP-mGBP2 Fusionskonstrukt

**Tabelle 2.7: Primer zur Klonierung von trunkierten GFP-mGBP2-Fusionskonstrukten.**

<b>Primername</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Verwendung</b>
pWPXL-GFP-mGBP2-G/GM-Domäne_fwd	ATT CCC GGG AAT GGC CTC AGA	pWPXL-GFP-mGBP2-G/GM/GE-Domäne-Fusionskonstrukte
pWPXL-GFP-mGBP2-G-Domäne_rev	GAT TAT CAT ATG ACT CAG CTG ATG GCA CC	pWPXL-GFP-mGBP2-G-Domäne-Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2-GM-Domäne_rev	GAT TAT CAT ATG ACT CAT GTG AGT GAC TGA TCC	pWPXL-GFP-mGBP2-GM-Domäne-Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2-ME-Domäne_fwd	ATT CCC GGG AAA TGG GTC TCT CC	pWPXL-GFP-mGBP2-ME-Domäne-Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2-E-Domäne_fwd	ATC CCG GGA GAG GCA GCA AAG	pWPXL-GFP-mGBP2-E-Domäne-Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2-ME/E-Domäne_rev	GAT TAT CAT ATG ACT CAG AGT ATA GTG CAC TTC CC	pWPXL-GFP-mGBP2-ME/E-Domäne-Fusionskonstrukte
pWPXL-GFP-mGBP2-GE-Domäne, G_fwd	ATT CCC GGG AAT GGC CTC AGA GAT CCA CAT GTC GGA ACC C	pWPXL-GFP-mGBP2-GE-Domäne-Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2-GE-Domäne, G_rev	GCT GCC TCG CTG ATG GCA CCA ACA TAG GTC TGC ACC AGG	pWPXL-GFP-mGBP2-GE-Domäne-Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2-GE-Domäne, E_fwd	GCC ATC AGC GAG GCA GCA AAG GAG GTA GAA GAG GAA CGT AC	pWPXL-GFP-mGBP2-GE-Domäne-Fusionskonstrukt
pWPXL-GFP-mGBP2-GE-Domäne, E_rev	GAT TAT CAT ATG ACT CAG AGT ATA GTG CAC TTC CCA GAC GAT TTG TTT TGC TTC AGG GT	pWPXL-GFP-mGBP2-GE-Domäne-Fusionskonstrukt

In Tabelle 2.8 sind Mutagenese-Primer zur Einführung von Punktmutationen in die GTPase-Domäne und in das CaaX Motiv von mGBP2 aufgeführt.

**Tabelle 2.8: Mutagenese-Primer zur Generierung von Punktmutanten von mGBP2 in pEGFP-C2 und pWPXL-GFP Vektoren.**

<b>Primername</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Verwendung</b>
pEGFP-C2-mGBP2-R48A_fwd	GGC AAT CGT GGG CCT CTA <b>CGC</b> CAC AGG CAA ATC CTA CCT G	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2-R48A_rev	CAG GTA GGA TTT GCC TGT <b>GGC</b> GTA GAG GCC CAC GAT TGC C	Mutagenese von mGBP2

pEGFP-C2-mGBP2-K51A_fwd	CAG GTA GGA TTT GCC TGT <b>GGC</b> GTA GAG GCC CAC GAT TGC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2-K51A_rev	GCT TGT TCA TCA GGT AGG <b>ATG CGC</b> CTG TGC GGT AGA GGC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2-E99A_fwd	GGT TCT GCT TGA CAC <b>TGC GGG</b> CCT TGA AGA TGT TGA G	Mutagenese von mGBP2
pWPXL-GFP-mGBP2-E99A_rev	CTC AAC ATC TTC AAG GCC <b>CGC</b> AGT GTC AAG CAG AAC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2-D182N_fwd	GTG TGG ACT CTG AGA <b>AAT</b> TTC TCC CTC GAG CTG G	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2-D182N_rev	CCA GCT CGA GGG AGA <b>AAT</b> TTC TCA GAG TCC ACA C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2-C586S_fwd	CAA ATC GTC TGG GAA <b>GAG</b> CAC TAT ACT CTGAGC GGC C	Mutagenese von mGBP2
pEGFP-C2-mGBP2-C586S_rev	GCG GTA CCG GAG TAT AGT <b>GCT</b> CTT CCC AGA CGA TTT G	Mutagenese von mGBP2
pWPXL-GFP-mGBP2-C586S_rev	ATA TCA TAT GTC AGA GTA TAG <b>TGC</b> TCT TCC CAG AC	Mutagenese von mGBP2

In Tabelle 2.9 sind Primer zur Einführung von einem HA-Marker an den N-Terminus von mGBP2 und die darauffolgende Klonierung in den pWPI Vektor aufgelistet.

**Tabelle 2.9: Primer zur Klonierung eines HA-mGBP2 Fusionskonstruktes in pWPI.**

Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pWPI-HA-mGBP2_fwd	AAT TTT AAT TAA ATG TAC CCA TAC GAC GTC CCA GAC TAC GCT GCC TCA GAG ATC C	pWPI-HA-mGBP2 Fusionskonstrukt
pWPI-HA-mGBP2_rev	ATT ATT AAT TAA TCA GAG TAT AGT GCA CTT CCC AGA CGA TTT GTT TTG CTT CAG GGT AT	pWPI-HA-mGBP2 Fusionskonstrukt

In Tabelle 2.10 sind Primer zur Klonierung von mGBP2 in den pFLAG-CMV2 Vektor mit einem N-terminalen FLAG-Marker aufgelistet.

**Tabelle 2.10: Primer zur Klonierung eines FLAG-mGBP2 Fusionskonstruktes in pFLAG-CMV2.**

Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pFLAG-mGBP2_fwd	ATT AGA TCT TGC CTC AGA GAT CCA CAT	pFLAG-CMV2-mGBP2 Fusionskonstrukt
pFLAG-mGBP2_rev	AAA TGT CGA CTC AGA GTA TAG TGC ACT TC	pFLAG-CMV2-mGBP2 Fusionskonstrukt

In Tabelle 2.11 sind Primer zur Klonierung von mGBP2, dessen GTPasen-, Isoprenylierungs- und Trunkationsmutanten, sowie von mGBP1 (1.1) und mGBP1 (2.1) in den pQE80L Vektor mit einem N-terminalen His<sub>6x</sub>-Marker aufgeführt.

**Tabelle 2.11: pQE80L Primer zur Klonierung von His<sub>6x</sub>-Fusionskonstrukten.**

<b>Primernamen</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Verwendung</b>
pQE80L-Punktmutanten von mGBP2_fwd	ATT GGA AGA TCT ATG GCC TCA GAG ATC CAC ATG T	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-Punktmutanten-Fusionskonstrukte
pQE80L-mGBP2-WT/G/GM/GE-Domäne_fwd	ATT GGA AGA TCT GCC TCA GAG ATC CAC ATG TC	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-WT/G/GM-Fusionskonstrukte
pQE80L-mGBP2-WT/ME/E/GE/Punktmutanten außer C586S_rev	ATT GTC GAC TCA GAG TAT AGT GCA CTT CCC	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-WT/ME/E/GE-Fusionskonstrukte
pQE80L-mGBP2-C586S_rev	ATT GTC GAC TCA GAG TAT AGT <b>GGA</b> CTT CCC	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-C586S-Fusionskonstrukt
pQE80L-mGBP2-G-Domäne_rev	ATT GTC GAC TCA GCT GAT GGC ACC AAC ATA	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-G-Domäne-Fusionskonstrukt
pQE80L-mGBP2-M/ME-Domäne_fwd	ATT GGA AGA TCT AAT GGG TCT CTC CCC TGC	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-M/ME-Domäne-Fusionskonstrukte
pQE80L-mGBP2-GM/M-Domäne_rev	ATT GTC GAC TCA TGT GAG TGA CTG ATC CGT C	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-GM/M-Domäne-Fusionskonstrukte
pQE80L-mGBP2-ME/E-Domäne_rev	ATT GGA AGA TCT AAT GGG TCT CTC CCC TGC	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-M/ME-Domäne-Fusionskonstrukte
pQE80L-mGBP2-E-Domäne_fwd	ATT GGA AGA TCT GAG GCA GCA AAC GAG GTA G	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-E-Domäne-Fusionskonstrukt
pQE80L-mGBP1 (1.1)_fwd	ATT GGA AGA TCT GCC TCA GAG ATC CAC ATG TC	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP1 (1.1)-Fusionskonstrukt
pQE80L-mGBP1 (1.1)_rev	ATT GTC GAC TTA AAG TAT GGT GCA TGA TCG AGG TG	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP1 (1.1)-Fusionskonstrukt
pQE80L-mGBP1 (2.1)_fwd	ATT GGA AGA TCT GCC TCA GAA ATC CAC ATG AAA GG	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP1 (2.1)-Fusionskonstrukt
pQE80L-mGBP1 (2.1)_rev	ATT GTC GAC TTA AAG TAT GGT GCA TGA TCG AGG TG	pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP1 (2.1)-Fusionskonstrukt



Tabelle 2.12 sind Primer zur Klonierung von mGBP1 (1.1) in den pCR II TOPO-Vektor und Mutagenese-Primer zur Einführung von Punktmutationen in die GTPase-Domäne und in das CaaX Motiv von mGBP1 (1.1) aufgeführt.

**Tabelle 2.12: Klonierungs- und Mutagenese-Primer zur Generierung von Punktmutanten von mGBP1 (1.1) im pCR II TOPO-Vektor.**

<b>Primername</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Verwendung</b>
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)_fwd	ATT CCC GGG AAT GGC CTC AGA AAT C	pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-Konstrukt
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)_rev	GAT TAT CAT ATG ACT TAA AGT ATG GTG CAT GAT C	pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-Konstrukt
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-H48A_fwd	GCA ATA GTG GGC TTC TAC <b>GCC</b> ACA GGC AAA TCC	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-H48A_rev	GGA TTT GCC TGT <b>GGC</b> GTA GAA GCC CAC TAT TGC	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1- (1.1)-K51A_fwd	CCA CAC AGG CGC <b>ATC</b> CTA TCT GAT GAA TAA GC	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-K51A_rev	GCT TAT TCA TCA GAT AGG <b>ATG</b> CGC CTG TGT GG	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-E99A_fwd	GCT TGA CAC <b>TGC</b> GGG CCT GAA AGA CAT GC	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-E99A_rev	GCA TGT CTT TCA GGC <b>CCG</b> CAG TGT CAA GC	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-D182N_fwd	GTG GAC TCT GAG <b>GAA</b> TTT CTC CCT GGA TC	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-D182N_rev	GAT CCA GGG AGA <b>AAT</b> TCC TCA GAG TCC AC	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-C586S_fwd	CCT CCA CCT CGA TCA <b>TCC</b> ACC ATA CTT TAA	Mutagenese von mGBP1 (1.1)
pTOPO2.1-mGBP1 (1.1)-C586S_rev	TTA AAG TAT GGT <b>GGA</b> TGA TCG AGG TGG AGG	Mutagenese von mGBP1 (1.1)

In Tabelle 2.13 sind Sequenzierungsprimer aufgeführt, die bei der Firma GATC zur Überprüfung des Klonierungserfolgs und der Verifikation der Insertsequenzen verwendet wurden.

Tabelle 2.13. Sequenzierungsprimer.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
pEGFP_C2-FP_fwd	GAT CAC ATG GTC CTG CTG	Klonierung in pWPXL-GFP-w/o-STOP
pEGFP_C2-FP_rev	TTT AAA GCA AGT AAA ACC TC	Klonierung in pWPXL-GFP-w/o-STOP
pWPXL 166979-rev	GAA TAC CAG TCA ATC TTT CAC	Klonierung in pWPXL-GFP-w/o-STOP
pWPXL GFP w/o STOP_fwd	AGA AGC GCG ATC ACA TG	Klonierung in pWPXL-GFP-w/o-STOP
pWPXL GFP w/o STOP_rev	GGA GCA ACA TAG TTA AG	Klonierung in pWPXL-GFP-w/o-STOP
T7_fwd	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Klonierung in pTOPO2.1
M13_rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	Klonierung in pTOPO2.1
pQE_fwd	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG	Klonierung in pQE80L
pQE_rev	GTT CTG AGG TCA TTA CTG G	Klonierung in pQE80L
pWPI 68423_fwd	CAA GCC TCA GAC AGT GGT TC	Klonierung in pWPI
pWPI PacI_rev	GTT TGT ATG TCT GTT GC	Klonierung in pWPI
pCMV-FLAG_fwd	TCG TAA TAA CCC CGC CCC GTT GAC	Klonierung in pFLAG-CMV2
pCMV-FLAG_rev	TCG TAA TAA CCC CGC CCC GTT GAC	Klonierung in pFLAG-CMV2

In Tabelle 2.14 sind die Sequenzen von Primern und Sonden, die für die RT-PCR verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 2.14: Sequenzen von Oligonukleotiden und Sonden für Realtime RT-PCR Versuche.

Primername	Sequenz (5'→3')	Sonde (#)
β-Aktin_fwd	TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA	FAM CTCTGGCT TAMRA (106)
β-Aktin_rev	CGC TCA GGA GGA GCA ATG	

Toxo-g-for (MWG)	GCT AAA GGC GTC ATT GCT GTT	FAM ATC GCA ACG GAG TTC TTC CCA
Toxo-g-rev (MWG)	GGC GGA ACC AAC GGA AAT	GAC GT BHQ(1)

Die Sonde für die  $\beta$ -Aktin-Primer ist Teil der Universal Probe Library der Firma Roche, Mannheim. Die Sonde für das *T. gondii* Haushaltsgen ist von Eurogentec, Belgien. In Klammern sind die Nummern der Sonden angegeben.

## 2.7 Plasmidvektoren

### 2.7.1 Ausgangsvektoren

Für die Klonierung und Expression von DNS-Sequenzen wurden verschiedene, teilweise kommerziell erhältliche Ausgangsvektoren verwendet, die in Tabelle 2.15 aufgelistet sind.

**Tabelle 2.15: Verwendete Ausgangsvektoren.**

Name	Eigenschaften	Referenz
pCR II-TOPO	Vektor zur direkten Klonierung von PCR Produkten, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , f1 ori, Col E1 ori, lac-Promotor, lacZ $\alpha$ - Fragment	Invitrogen
pEGFP-C2	Expressionsvektor für N-terminales eGFP-Fusionsprotein, CMV-Promotor, Kan <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	Clontech
pEGFP-C2-mGBP1 (2.1)	Expressionsvektor für N-terminales EGFP-mGBP2.1 Fusionsprotein, CMV-Promotor, Kan <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)
pLP/VSVG	Expressionsvektor zur lentiviralen Transduktion (envelope), Expression des VSV-G Gens (VSV G Glycoprotein), CMV-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pFLAG-CMV-2	Transienter Expressionsvektor für N-terminales Met-FLAG-Fusionsprotein, SV40 ori, CMV-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Sigma-Aldrich
psPAX2	Expressionsvektor zur lentiviralen Transduktion (Packaging), Expression von Gag, Pol und Env, CMV-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Labor Trono (Yang et al., 2012)
pQE80L	Expressionsvektor für N-terminales His <sub>6x</sub> -Fusionsprotein, T5 Promotor/lac Operator-element, lacZ $\alpha$ -Fragment, Col E1 ori, $\beta$ -Lactamase kodierende Sequenz, Amp <sup>R</sup>	Qiagen
pSV40	Adenovirus-Vektor zum Immortalisieren von Zellen, Amp <sup>R</sup>	Prof. Dr. Osamu Takeuchi, Research Institute for Microbial

		Diseases, Osaka University, Japan
pWPI	Expressionsvektor mit IRES-eGFP, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Labor Trono, (Zhang and Tandon, 2012)
pWPXL-GFP-w/o-STOP	Expressionsvektor für N-terminale GFP-Fusionsproteine, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)
pWPXL-GFP-mGBP2	Lentiviraler Expressionsvektor für ein GFP-mGBP2-Konstrukt, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)
pWPXL-GFP-mGBP2-R48A	Lentiviraler Expressionsvektor für ein GFP-mGBP2-Konstrukt, in dem das P-Schleifen-Arginin mutiert ist, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)
pWPXL-GFP-mGBP2-K51A	Lentiviraler Expressionsvektor für ein GFP-mGBP2-Konstrukt, in dem das P-Schleifen-Lysin mutiert ist, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)
pWPXL-GFP-mGBP2-E99A	Lentiviraler Expressionsvektor für ein GFP-mGBP2-Konstrukt, in dem die Switch II Glutaminsäure mutiert ist, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)
pWPXL-GFP-mGBP2-D182N	Lentiviraler Expressionsvektor für ein GFP-mGBP2-Konstrukt, in dem die G4 Motiv Asparaginsäure mutiert ist, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)
pWPXL-GFP-mGBP2-C586S	Lentiviraler Expressionsvektor für ein GFP-mGBP2-Konstrukt, in dem die Isoprenylierungsstelle mutiert ist, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)
pWPXL-GFP-mGBP1 (1.1)	Lentiviraler Expressionsvektor für ein GFP-mGBP1 (1.1)-Konstrukt, EF1- $\alpha$ -Promotor, Amp <sup>R</sup>	(Dissertation C. Konermann, 2008)

## 2.7.2 Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide

In Tabelle 2.16 sind alle in dieser Arbeit generierten Plasmidvektoren aufgelistet.

**Tabelle 2.16: Hergestellte Plasmide.**

Name	Vektor	Insert	Eigenschaften
pWPI-HA-mGBP2	pWPI	HA-mGBP2 ORF	Lentivirale Transduktion
pFLAG-CMV2-mGBP2	pFLAG-CMV2	mGBP2 ORF	Transiente Transfektion
pWPXL-GFP mGBP2-G	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2-G ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP2-GM	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2-GM ORF	Lentivirale Transduktion

pWPXL-GFP mGBP2-GE	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2-GE ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP2-ME	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2-ME ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP2-E	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP2-E ORF	Lentivirale Transduktion
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-WT	pQE80L	mGBP2 ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-R48A	pQE80L	mGBP2-R48A ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-K51A	pQE80L	mGBP2-K51A ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-E99A	pQE80L	mGBP2-E99A ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-D182N	pQE80L	mGBP2-D182N ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-C586S	pQE80L	mGBP2-C586S ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-G	pQE80L	mGBP2-G ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-GM	pQE80L	mGBP2-GM ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-GE	pQE80L	mGBP2-GE ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-M	pQE80L	mGBP2-M ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-ME	pQE80L	mGBP2-ME ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP2-E	pQE80L	mGBP2-E ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP1 (1.1)	pQE80L	mGBP1.1 ORF	Bakterielle Überexpression
pQE80L-His <sub>6x</sub> -mGBP1 (2.1)	pQE80L	mGBP2.1 ORF	Bakterielle Überexpression
pWPXL-GFP mGBP1 (1.1)-H48A	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP1.1-H48A ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP1 (1.1)-K51A	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP1.1-K51A ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP1 (1.1)-E99A	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP1.1-E99A ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP1 (1.1)-D182N	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP1.1-D182N ORF	Lentivirale Transduktion
pWPXL-GFP mGBP1 (1.1)-C586S	pWPXL-GFP-w/o-STOP	mGBP1.1-C586S ORF	Lentivirale Transduktion

Die erfolgreiche Klonierung sämtlicher Konstrukte wurde durch Restriktionsanalysen überprüft und anschließend eine Sequenzierung des Inserts bei der Firma GATC durchgeführt.

## **2.8 Zellbiologische Methoden**

### **2.8.1 Allgemeine Zellkultur**

Die Arbeiten mit Zellkulturen fanden an Sterilbänken (Laminar AIR Flow) unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen statt. Zudem wurde grundsätzlich mit Laborhandschuhen (Latex oder Nitril) gearbeitet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

### **2.8.2 Kultivierung von Zelllinien**

MEF, NIH 3T3 und 293FT Zellen wurden alle 2 Tage mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in Medium verdünnt auf neue Platten ausplattiert. HS27 und HFF Zellen, zur Kultivierung von Toxoplasmen, wurden in T75 Flaschen (Nunc) bis Passage 40 passagiert. Von konfluent bewachsenen Flaschen wurde einmal wöchentlich das Medium gewechselt. Dicht bewachsene T75 Flaschen wurden gesplittet, indem die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend kurz mit Trypsin/EDTA überschichtet und für 10 min im Brutschrank inkubiert wurden. Die Reaktion wurde mit Komplett-Medium abgestoppt. Vereinzelte Zellen wurden 1:6 in T25 Flaschen umgesetzt.

### **2.8.3 Kultivierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten**

Embryonale Fibroblasten (EF) wurden aus C57BL/6 Embryonen am Tag 14 p.c. gewonnen. Hierbei wurde den Spendertieren der Uterus steril entnommen und in eine Petrischale mit Medium gelegt. Die Embryonen wurden anschließend aus dem Uterus präpariert und der Kopf und die fötale Leber entfernt. Das restliche embryonale Gewebe wurde durch ein Sieb (100 µm Porengröße, BD) homogenisiert und in EF Medium kultiviert. Die EF Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen mit etwa  $5 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Anschließend wurde alle zwei Tage frisches Medium auf die Zellen gegeben. Bei konfluentem Wachstum wurden die EF Zellen in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **2.8.4 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen eines Aliquots der Zellsuspension mit 0,16% Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer. Trypanblau ist ein saurer Azofarbstoff, welcher an Zellproteine bindet. Es dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytoplasma und färbt diese Zellen, im Gegensatz zu lebenden Zellen, tiefblau.

### **2.8.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden zu größeren Zellzahlen expandiert, vor dem Einfrieren mit Trypsin/EDTA vereinzelt und die Reaktion mit Komplett-Medium abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1.200 UpM (Megafuge) abzentrifugiert und der Überstand entfernt.  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 mL Einfriermedium (40% FKS (bzw. NKS) insgesamt, 10% DMSO) aufgenommen, in Cryotubes aliquotiert, für 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann Ü/N bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen können so bis zu 6 Wochen aufbewahrt werden. Zur längeren Konservierung der Zellen wurden die Cryotubes anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die Zellen wurden einmal in vorgewärmtem Zellkulturmedium gewaschen, um sie von DMSO zu befreien und danach in Medium ausgesät.

### **2.8.6 Transfektion mittels Transfektionsreagenzien**

Die transiente Transfektion mittels Jet PEI (Polyplus), Lipofectamine2000 (Sigma-Aldrich) oder Turbofect (MBI Fermentas) Transfektionsreagenzien erfolgte gemäß den Herstellerprotokollen. Es wurden  $2 \times 10^5$  Zellen (NIH 3T3 oder MEFs) in 2 mL Medium in einer 6-well Platte ausplattiert. Nach 24 h wurden 6  $\mu\text{L}$  Jet PEI oder 4  $\mu\text{L}$  Turbofect mit 150 mM NaCl auf 100  $\mu\text{L}$  bzw. 400  $\mu\text{L}$  aufgefüllt, oder 10  $\mu\text{L}$  Lipofectamine in 250  $\mu\text{L}$  HBSS gelöst und 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 3  $\mu\text{g}$  Expressionsvektor für Jet PEI und 4  $\mu\text{g}$  für Turbofect und Lipofectamine in denselben Lösungsmitteln und in korrespondierenden Volumina, wie zuvor die entsprechenden Transfektionsreagenzien, verdünnt. Die Transfektionsreagenzien wurden anschließend tropfenweise und unter ständigem Mischen zu den DNS-Lösungen zupipettiert. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Lösungen auf die Zellen getropft, bei denen zuvor ein Mediumwechsel



stattgefunden hat (für Lipofectamine Transfektion Medium ohne P/S). Nach 24 h Stunden wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h (insgesamt 48 h) wurde der Erfolg der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop oder per Western Blot (s. 2.10.11) kontrolliert.

## 2.8.7 Lentivirale Transduktion zur Herstellung stabiler Zelllinien

Der virale Gentransfer ist eine effektive Methode, um genetisches Material stabil in eine Vielzahl von Zielzellen zu transportieren. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten lentiviralen Vektoren sind nicht replikationsfähig, und sie durchlaufen den lentiviralen Replikationszyklus nur bis zur Integration in die Zielzelle und werden daher als sich selbst inaktivierend bezeichnet. Für die Herstellung lentiviraler Überstände wurden drei verschiedene Plasmide transient in 293FT Zellen transfiziert. Eines dieser drei Plasmide trug das Gen, das in der Zielzelle exprimiert werden sollte. Als Ausgangsvektor wurde das pWPXL-GFP-w/o-STOP Plasmid oder der pWPI Vektor verwendet, welche das zu exprimierende Gen unter der Transkriptionskontrolle eines EF1 $\alpha$ -Promotors codieren. Die beiden Vektoren enthalten zudem auch noch alle weiteren für Transkription, Verpackung, reverse Transkription und Integration notwendigen *cis*-aktiven lentiviralen Sequenzen. Das zweite für die Virusproduktion verwendete Plasmid trägt die Gene *gag*, *pol* und *rev*, welche für die Verpackung der Viren essentiell sind. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektor psPAX2 der zweiten Generation sind zusätzliche Gene des Virus wie zum Beispiel *vpr*, *vif*, *vpu* oder *nef* deletiert (Zufferey et al., 1998). Das dritte Plasmid enthält die genetische Information für das G Protein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G), das als Hüllprotein zur Pseudotypisierung der Viren fungiert. Mit Hilfe der grünen Fluoreszenz des eGFP-Proteins (hier GFP genannt) konnte die Transduktionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie ermittelt werden.

### 2.8.7.1 Virusproduktion mittels 293FT Zelllinie

Die Virusproduktion erfolgte in der 293FT Zelllinie, die sich für die Hochtiter-Lentivirus-Produktion bewährt hat. Die Zelllinie, propagiert als ein Klon aus einer humanen embryonalen Milz und transformiert mit dem großen SV40 T-Antigen, zeichnet sich durch schnelles Wachstum und hohe Transfektionsraten aus. Am Tag vor der

Transfektion wurden  $5 \times 10^6$  293FT Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale in DMEM-Medium (s. 2.3.1) ausgesät. Zur Transfektion wurden 20 µg des Expressionsvektors, 15 µg des Verpackungsvektors psPAX2 und 5 µg des Hüllproteinvektors pLP/VSVG gemischt und auf 250 µL mit 2,5 mM HEPES aufgefüllt. Nach der Zugabe von 250 µL 0,5M CaCl<sub>2</sub> wurde die Lösung unter Vortexen zu 500 µL 2 x HEBS-Lösung in sterilen Röhrchen tropfenweise pipettiert und 35-40 Minuten bei RT inkubiert, so dass sich ein feiner Niederschlag aus Kalziumphosphat und DNS bilden konnte. In der Zwischenzeit wurde ein Mediumwechsel bei den 293FT Zellen vorgenommen, indem das Kulturmedium der Zellen gegen 10 mL FKS-freies Medium ausgetauscht wurde. Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen unter Schwenken getropft, die danach für 6 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden. Nachfolgend wurde das Medium mitsamt DNS-Präzipitat entfernt und 6 mL FKS-haltiges Kulturmedium zu den 293FT Zellen gegeben. 48 h später wurde der Virusüberstand geerntet. Dazu wurde das Medium von den Platten abgenommen und für 10 min bei 2.000 UpM zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde der virenhaltige Überstand durch ein 0,45 µm Zellsieb filtriert, in Cryotubes aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

### **2.8.7.2 Lentivirale Transduktion von Zielzellen (NIH 3T3, MEF)**

Einen Tag vor der Transduktion wurden  $3 \times 10^4$  MEF oder  $5 \times 10^4$  NIH 3T3 Fibroblasten auf 24-well Platten ausplattiert. Am Tag der Transduktion wurde das DMEM-Medium von den Zellen abgenommen und das Gemisch aus 500 µL Virusüberstand und 25 µg Polybrene auf die Zellen gegeben. Diese wurden für 30 min im Brutschrank bei 37°C temperiert, die Platte anschließend zwecks Sterilität mit Parafilm umwickelt und für 2 h bei 1.200 UpM und 32°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Parafilmabklebung entfernt und die Zellen für weitere 4 h im Brutschrank mit dem Virusüberstand inkubiert. Nach einem Mediumwechsel (DMEM) wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Die transduzierten Zellen wurden alle 2 Tage bis zur 10 cm Kulturschale auf eine größere Zellkulturplatte umgesetzt. Der Erfolg der Transduktion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie überprüft. Nach 7-14 Tagen wurden die GFP-positiven Zellen über einen durchflusszytometrischen Sortiervorgang angereichert (Dr. Daniel Degrandi).

### 2.8.8 Stimulation von Zellen

Die Stimulation der verschiedenen primären Zellen und Zelllinien erfolgte in den in Abschnitt 2.3.3 angegebenen Nährmedien, wobei die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte eine ca. 75%ige Konfluenz erreicht hatten. Zur Induktion wurden die Zellen für 16-24 h mit 100-200 U/mL murinem IFN- $\gamma$  (R&D) behandelt. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe der entsprechenden Substanzmenge zum Nährmedium.

### 2.8.9 Immunfluoreszenz-Färbung

Für intrazelluläre Färbungen wurde die Methode der Immunfluoreszenz angewendet. Dafür wurden Zellen am Vortag in 24-well-Platten auf sterilen 13 MM Glasdeckelchen im DMEM-Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde bei nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Zellen das Medium unter der Sterilbank abgenommen. Die Zellen wurden zunächst für 5 min unter Schwenken in PBS gewaschen, anschließend für 15 Minuten bei RT in 4% Paraformaldehyd (PFA) im Dunkeln auf einem Schüttler fixiert und nochmals für 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,02% Saponin/PBS für 15 Minuten bei RT abgedunkelt permeabilisiert. Zum Permeabilisieren der Zellkernmembran wurden 0,05% Saponin/PBS eingesetzt. Anschließend wurde mit 0,002% Saponin/PBS + 2% Ziegen Serum 20 min bei RT abgedunkelt geblockt. Zur Inkubation der Zellen mit einem Primärantikörper wurde dieser in 0,0002% Saponin/PBS + 0,2% Ziegen Serum verdünnt und für 1 h bei RT oder bei 4°C Ü/N abgedunkelt inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal 5 min mit 0,0002% Saponin/PBS gewaschen und mit einem Sekundärantikörper, verdünnt in 0,0002% Saponin/PBS + 0,2% Ziegen Serum, für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden die Zellkerne in DAPI Lösung (1:2500 in PBS verdünnt) 3 min bei RT gefärbt und anschließend wieder mit PBS für 5 min gewaschen. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden mit Fluoromount-G auf Objektträger fixiert und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.8.10 Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

Zur Vermehrung der avirulenten Typ II ME49 *T. gondii* wurden die Parasiten in T25 Zellkulturflaschen mit einem Monolayer von HS27 oder HFF Fibroblasten im IMDM-Medium kultiviert. Nach Vermehrung der Toxoplasmen wurde der Überstand

abgenommen, bei 50 x *g* (600 UpM) und 32°C 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Bei einer weiteren Zentrifugation des Überstandes mit 600 x *g* (1.800 UpM) für 15 min bei 32°C wurden die Parasiten pelletiert. Diese wurden anschließend in frischem IMDM-Zellmedium resuspendiert. Für die weitere Passage wurden 0,5-1 x 10<sup>6</sup> Parasiten in eine T25 Zellkulturflasche mit HS27/HFF Fibroblasten gegeben.

### **2.8.11 *In vitro* Infektion mit *Toxoplasma gondii***

3 x 10<sup>4</sup> Zellen, die die mGBP2-Konstrukte bzw. den Leervektor stabil exprimierten oder unbehandelt blieben, wurden auf Glasdeckelchen in 24-well-Platten ausgesät und im Brutschrank Ü/N inkubiert. 8 h später wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  (200 U/mL) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen im Verhältnis 1:50 (Zellen:Parasiten) mit *T. gondii* (Stamm ME49) für Zeiträume zwischen 0 und 48 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 15 min im Dunkeln mit 4% PFA/PBS Lösung fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Falls beschrieben wurden die GTPasen und die intrazellulären Parasiten mittels Immunfluoreszenztechnik angefärbt (s. 2.8.9).

### **2.8.12 Bestimmung der Rekrutierungsraten von mGBP2 und mGBP2-Mutanten zur parasitophoren Vakuole (PV) von *T. gondii***

3 x 10<sup>4</sup> NIH 3T3 Fibroblasten oder mGBP2<sup>-/-</sup> bzw. wildtypische MEF Zellen, die die GFP-mGBP2-Konstrukte oder HA-mGBP2 bzw. die entsprechenden Leervektoren stabil exprimierten, oder unbehandelte Zellen, wurden, wie unter 2.8.11 beschrieben, ausplattiert, mit IFN- $\gamma$  stimuliert und für Zeiträume zwischen 0 und 48 h mit *T. gondii* infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Proteine und die intrazellulären Parasiten mittels Immunfluoreszenztechnik angefärbt (s. 2.8.9). Zur Bestimmung der Rekrutierungsraten der Proteine zur PV von *T. gondii* wurden etwa 500 intrazelluläre Toxoplasmen gezählt. Die Raten stellten das Verhältnis zwischen den mit mGBP2 und dessen Mutanten assoziierten Parasiten und den mGBP2 freien Toxoplasmen dar.

### 2.8.13 Bestimmung der *T. gondii* Proliferation

#### <sup>3</sup>H-Uracil Inkorporation durch *T. gondii*

3 x 10<sup>4</sup> mGBP2 defiziente oder GFP-mGBP2-Konstrukte stabil exprimierende MEF Zellen bzw. GFP-Kontrollzellen oder wildtypische MEF Zellen wurden in 200 µL DMEM-Medium in 96-well Flachbodenplatten für dreifach Bestimmungen ausgesät und nach dem Absetzen mit IFN-γ in Konzentrationen zwischen 1-100 U/mL stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 24 h wurden 2-3 x 10<sup>4</sup> ME49 Toxoplasmen und 48 h später 10 µL <sup>3</sup>H-Uracil (1:10; 0,037 MBq/well) zur Proliferationsmessung der Parasiten zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Platten zur Abtötung der Zellen und der Toxoplasmen für 24 h bei -20°C gelagert. Die Messung des in die proliferierten Toxoplasmen eingebauten <sup>3</sup>H-Uracils erfolgte im Betaplate Liquidscintillationscounter.

## 2.9 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 2.9.1 Analytische Plasmidpräparation aus Bakterien

Für die analytische Plasmidpräparation wurde eine einzelne, frisch gepickte *E. coli* Kolonie in 2 mL antibiotikahaltigem LB-Medium in sterilen Kulturröhrchen Ü/N bei 37°C schüttelnd bei 200 UpM inkubiert. Die Plasmidpräparation aus der Übernachtskultur erfolgte gemäß Herstellerangaben (Zymo Research, Mini Kit Protokoll bzw. Roche, Plasmidisolationsprotokoll). Positive Klone mit der gewünschten Plasmid-DNS wurden mittels Restriktionsanalyse und Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem analytischen Agarosegel identifiziert und anschließend sequenziert (Firma GATC). Übernachtskulturen, die Plasmid-DNS mit der richtigen Sequenz trugen, wurden in 200 mL Kulturen expandiert und daraus die Plasmid-DNS gewonnen (s. 2.9.2). Alternativ wurde die Plasmid-DNS mittels einer Retransformation in *E. coli* amplifiziert (s. 2.9.6).

### 2.9.2 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterien

Bei der präparativen Plasmidisolierung wurde eine einzelne, frisch gepickte Bakterienkolonie in 2 mL antibiotikahaltigem LB-Medium in sterilen Kulturröhrchen für ~ 8 h schüttelnd bei 200 UpM inkubiert. Die Vorkultur wurde dann 1/1000 in 200 mL antibiotikahaltigem Nährmedium verdünnt und Ü/N bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmidpräparation aus der Übernachtskultur erfolgte gemäß Herstellerangaben

(Macherey und Nagel, Maxi Kit Protokoll). Die DNS-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt (NanoDrop, Thermo Scientific). Die Reinheit der DNS-Lösung konnte über den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt und anschließend die Plasmid-DNS über Restriktionsanalyse verifiziert werden. Die Plasmid-DNS wurde bei -20°C gelagert.

### **2.9.3 Agarosegelelektrophorese**

#### **Analytische Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode für die Auftrennung von DNS-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Nukleinsäuren sind innerhalb eines sehr großen pH-Bereichs negativ geladen und wandern daher im elektrischen Feld in Richtung Anode. Hierbei erfolgt im Agarosegel eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die Migrationsgeschwindigkeit dem Logarithmus ( $\log_{10}$ ) der Fragmentgröße (in bp) invers proportional ist. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid in der Gelmischung, welches in die Doppelhelix der DNS interkaliert, fluoreszieren die Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (254-366 nm), da der eingebaute Farbstoff durch UV-Licht angeregt wird. Er emittiert infolgedessen Licht im orange-roten Bereich (590 nm), so dass das Bandenmuster auch photographisch festgehalten und analysiert werden kann. Agarosegelelektrophoresen wurden durchgeführt, indem 1-1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht wurden, bis eine klare homogene Lösung entstand. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Handwärme wurde Ethidiumbromid (4  $\mu\text{g/mL}$ ) zugegeben, die Lösung in eine Gelkammer mit den gewünschten Kämmen gegossen und gewartet, bis sich die Lösung zu einer Gelmatrix verfestigt hatte. Anschließend wurde die Gelkammer mit dem ausgehärteten Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die 1:5 mit dem Auftragspuffer vermischten DNS-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese je nach Gelgröße bei 80-100 V durchgeführt. Für analytische Zwecke wurde das Gel mit UV-Licht bei 265 nm bestrahlt und das Bandenmuster anhand der Ethidiumbromidfluoreszenz dokumentiert.

#### **Präparative Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNS über Agarosegele wurde neben der DNS-Analyse auch für die selektive Elution von PCR-Produkten und Plasmiden,

beispielsweise auch nach restriktionsenzymatischer Spaltung, genutzt. Nach der Agarosegelelektrophorese (s. o.) konnten gewünschte DNS-Fragmente über die größenspezifische Auftrennung im Gel unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) identifiziert und nachfolgend daraus ausgeschnitten werden. Aus dem isolierten Gelstück wurde die DNS mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kits“ (Roche) oder mit dem PCR-Gelextraktionskit (Zymo Research) extrahiert. Die Vorgehensweise entsprach der dem Kit beiliegenden Anleitung des Herstellers.

### **Bestimmung von DNS-Fragmentgrößen**

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNS-Moleküle und gegebenenfalls auch deren Konzentration abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der „MassRuler™ DNA Ladder Mix“ der Firma MBI Fermentas als Größenstandard verwendet.

## **2.9.4 Enzymatische Behandlung von DNS**

### **Restriktionsanalyse von DNS**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische, palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNS. Sie katalysieren die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen beider Stränge, infolgedessen DNS-Moleküle mit definierten Enden entstehen, welche sich für Klonierungszwecke eignen. Die durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente wurden auch als Sonden eingesetzt, um spezifische Sequenzen durch Hybridisierung zu identifizieren. Für eine vollständige enzymatische Reaktion wurden 2-5 Einheiten Restriktionsenzym pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNS und bis zu 10 Einheiten Enzym pro  $\mu\text{g}$  genomischer DNS eingesetzt. Es wurden Restriktionsenzyme der Firmen MBI Fermentas, NEB und Roche verwendet. In Tabelle. 2.17 ist der allgemeine Ansatz eines Restriktionsverdaus aufgelistet.

**Tabelle 2.17: Restriktionsverdau.**

<b>Zusammensetzung</b>	<b>Volumen</b>
DNS	x $\mu\text{L}$
Puffer (10x)	3 $\mu\text{L}$
Enzym	2–5 Einheiten/ $\mu\text{g}$ DNS
ddH <sub>2</sub> O	ad 30 $\mu\text{L}$

Die Menge des eingesetzten Enzyms sollte 10% des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da die Reaktion durch einen zu hohen Anteil des Enzymkonservierungsmittels Glycerin beeinträchtigt werden kann. Zu bestimmten Reaktionsansätzen empfiehlt es sich Rinderserumalbumin (BSA) aus dem jeweiligen Herstellerkit (20 µg/mL Endkonzentration für Enzyme von MBI Fermentas und 100 µg/mL für Enzyme von NEB) hinzuzufügen. Es beschichtet das Reaktionsgefäß, sodass das Restriktionsenzym frei in Lösung und damit aktiv bleibt. Die Restriktionsansätze wurden 1-2 h bei der für die jeweilige Enzymaktivität optimalen Temperatur inkubiert und mittels Gelelektrophorese analysiert.

### **Dephosphorylierung von DNS**

Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase werden die 5'-Enden eines Vektors dephosphoryliert, so dass eine Selbstligation eines Vektors mit kompatiblen Enden vermieden und zudem die gewünschte Ligation zwischen Vektor und DNS-Fragment begünstigt wird. Nach dem Restriktionsverdau der Plasmid-DNS wurden die Restriktionsenzyme für 15 min bei 65°C deaktiviert und die Ansätze 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden für die Dephosphorylierung dem Reaktionsansatz zwei Einheiten alkalische Phosphatase (SAP, 2 µL), 4 µL Puffer und 6 µL ddH<sub>2</sub>O zugegeben und dieser dann 1 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min, um eine bei der nachfolgenden Ligation störende Enzymaktivität zu vermeiden. Alternativ wurde der geschnittene und dephosphorylierte Vektor über die Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion (s. 2.9.3) aufgereinigt.

## **2.9.5 Ligation von DNS-Molekülen**

### **DNA Ligation Kit <Mighty Mix> von TAKARA BIO INC.**

Die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende linearer DNS-Moleküle. Das Enzym verbindet sowohl überstehende als auch glatte Enden miteinander. Eine effiziente Ligation doppelsträngiger DNS-Moleküle erfordert ein passendes molares Verhältnis der zu ligierenden DNS-Fragmente. Dieses sollte in etwa 1:3 von Vektor zu DNS-Fragment betragen. Das Kit stellt ein fertiges Reaktionsgemisch dar und enthält die T4-DNS-Ligase. Hierfür wurden Vektor und DNS-Insert im molaren



Verhältnis 1:3 in einem Volumen von 5  $\mu\text{L}$  zusammengemischt und dazu 5  $\mu\text{L}$  Ligasemix pipettiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit ddH<sub>2</sub>O statt Insert-DNS mit und ohne Ligasemix. Inkubiert wurde für 30 min bis 1 h bei 16°C.

### **TOPO TA Cloning® Kit**

Bei Klonierungen von PCR-Produkten, die mittels des Taq-Tgo-Polymerase-Gemisches (Roche) amplifiziert wurden (s. 2.9.8), in den Vektor pCR II-TOPO (s. 2.1.5) wird die Eigenschaft thermostabiler DNS-Polymerasen an alle doppelsträngigen DNS-Moleküle ein Desoxyadenosin an deren 3'-Ende anzufügen, ausgenutzt. PCR-Produkte können so direkt in den linearisierten Vektor kloniert werden, der die kompatiblen Desoxythymidin-Überhänge am 3'-Ende besitzt. Die an den TOPO-Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I (aus VSV) bindet an den DNS-Doppelstrang an einer bestimmten Sequenz und spaltet die Phosphodiesterbindung eines Stranges (Shuman, 1991). Die Energie aus dieser Reaktion wird für die Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3' Phosphat des geschnittenen Stranges und Tyr274 des Enzyms geschöpft. Diese Bindung kann nachfolgend von dem 5' Hydroxylende des PCR-Fragments attackiert werden, dabei wird die Topoisomerase I freigesetzt und der Ligationsprozess abgeschlossen (Shuman, 1994). Es wurden 0,5-4  $\mu\text{L}$  frisch gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Dazu wurden 1  $\mu\text{L}$  Salzlösung und 1  $\mu\text{L}$  pCR II-TOPO-Vektor hinzugegeben und auf 6  $\mu\text{L}$  mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für 5 min bei RT, woraufhin 2  $\mu\text{L}$  des Ansatzes direkt in *E. coli* transformiert (s. 2.9.6) wurden.

### **2.9.6 Transformation von *E. coli* Bakterien**

CaCl<sub>2</sub> behandelte Bakterien können durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid-DNS transformiert werden (Cohen et al., 1972). Hierfür werden die Bakterienstämme DH5 $\alpha$  (Hanahan and Meselson, 1983) oder Rosetta (Novagen) verwendet. 100  $\mu\text{L}$  der kompetenten Bakterien (Lagerung bei -80°C) wurden kurz auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz bzw. etwa 100 ng zirkuläre doppelsträngige DNS zupipettiert. Anschließend wurde für 10-30 min auf Eis inkubiert, um die Gleichverteilung der DNS zu gewährleisten. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für eine Minute. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  antibiotikafreiem LB-Medium wurde für 1 h bei 37°C im Schüttler bei 750 UpM inkubiert, um die Expression der plasmidkodierte Antibiotikumresistenz zu

ermöglichen. Der Gesamtansatz wurde auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und Ü/N bei 37°C wachsen gelassen. Positive Klone wurden anschließend über Plasmidisolierung (s. 2.9.3) und Restriktionsanalyse (s. 2.9.4) verifiziert.

### **2.9.7 Cryokonservierung von Bakterien**

Für eine dauerhafte Lagerung verschiedener Bakterienstämme wurden Glycerinstammkulturen angelegt. Hierzu wurden 500 µL einer sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur mit 500 µL sterilem Glycerin (98%) vermischt und die Lösung vorsichtig homogenisiert. Anschließend erfolgte nach einem kurzen Kälteschock im flüssigen Stickstoff eine Lagerung der Bakterien bei -80°C.

### **2.9.8 Amplifikation von DNS-Molekülen mittels PCR**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur selektiven Vervielfältigung definierter Nukleinsäuresequenzen eingesetzt und beruht auf der Eigenschaft der DNS-Polymerasen, einzelsträngige DNS als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges zu verwenden (Mullis, K. et al., 1992). Die Grundlage einer PCR stellen zyklische Temperaturveränderungen dar. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNS durch Hitze, hybridisieren durch Abkühlung spezifische Oligonukleotidprimer an die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden DNS-Fragments. Durch Erhitzen auf 72°C kann nun die thermostabile Polymerase den Komplementärstrang synthetisieren. Eine zyklische Wiederholung in der Abfolge von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Verlängerung des DNS-Stranges über 30-35 Zyklen führt zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNS-Fragmentes. In dieser Arbeit wurde für die Durchführung der PCRs ein DNS-Polymerase-Gemisch „High Fidelity“ (Taq und Tgo, Roche) gewählt, welche eine sehr gute Produktivität und auf Grund der Korrekturaktivität (3'→5' Exonukleaseaktivität) der Tgo-Polymerase eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Tabelle 2.18 zeigt einen Standard-PCR-Ansatz.

**Tabelle 2.18: Standard-PCR-Ansatz.**

Reagenz	Volumen
DNS	ca. 250 ng
10 x PCR-Puffer	5 $\mu$ L
dNTP-Mixtur (enthält 1 mM jedes dNTP)	1 $\mu$ L
Primer 1 (20 pmol)	1 $\mu$ L
Primer 2 (20 pmol)	1 $\mu$ L
DNS Polymerase (2 Einheiten/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ L

Die Durchführung sämtlicher PCRs erfolgte, indem die Reaktion auf Eis angesetzt, kurz durch Schnippen gemischt und abzentrifugiert wurde. In Tabelle 2.19 sind die Bedingungen aufgeführt, unter welchen die PCRs durchgeführt wurden. Die Temperatur für die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer ist sequenzabhängig, die Extensionsdauer jeder PCR hängt von der Größe des zu amplifizierenden PCR-Produktes ab. In der Regel wird ca. eine Minute pro 1000 amplifizierte Basenpaare benötigt.

**Tabelle 2.19: Programmierung unter Standard-PCR-Bedingungen.**

Funktion	Dauer	Temperatur	Anzahl Zyklen
DNS-Denaturierung	2 min	94°C	
DNS-Denaturierung	30 sec	94°C	10 x
Primerhybridisierung	30 sec	55-68°C	
Primerverlängerung	variabel	72°C	
DNS-Denaturierung	30 sec	94°C	20 x
Primerhybridisierung	30 sec	55-68°C	
Primerverlängerung	variabel + $\sum$ 20 s	72°C	
Pause	unendlich	4°C	

Zur Erstellung der Deletionsmutante mGBP2-GE wurden zunächst zwei PCRs unternommen, bei denen DNS-Sequenzen mit sehr langen Überhängen erzeugt wurden. Hierzu wurde das „Expand Long Template PCR System“ (Roche) verwendet. Nach Reinigung der PCR-Produkte wurde 1  $\mu$ L des Amplifikats der einen Domäne in 100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O verdünnt, auf 60°C erhitzt, um den Doppelstrang zu denaturieren, dann 1  $\mu$ L des Amplifikats der anderen Domäne zupipettiert und auf RT abkühlen lassen. Für die anschließende PCR wurden 10  $\mu$ L des Ansatzes verwendet.

### 2.9.9 Mutagenese-PCR

Zur Insertion einzelner Mutationen in eine DNS wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet. In Tabelle 2.20 ist die Zusammensetzung für die Mutagenese-PCR angegeben. Beide Mutagenese-Primer müssen die gewünschte Mutation enthalten und die zu mutierende Nukleotidsequenz mit 15-25 Basenpaaren 5' und 3' flankieren. Die Primer müssen an dieselbe Sequenz auf den gegenüberliegenden Strängen der Plasmid-DNS binden. In Tabelle 2.20 ist ein Standard-Mutagenese PCR-Ansatz aufgeführt.

**Tabelle 2.20: Standard-Mutagenese-PCR-Ansatz.**

Reagenz	Volumen
DNS	5-50 ng
5 x PCR-Puffer	10 µL
dNTP-Mixtur	1 µL
Primer 1	125 ng
Primer 2	125 ng
<i>PfuTurbo</i> Polymerase (2,5 Einheiten/µL)	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

In Tabelle 2.21 sind die Bedingungen aufgeführt, unter welchen die Mutagenese-PCRs durchgeführt wurden. Die Elongationszeit wird mit ca. 1 min pro 1000 amplifizierte Basenpaare berechnet.

**Tabelle 2.21: Standard-Bedingungen für die Mutagenese-PCR-Programmierung.**

Funktion	Dauer	Temperatur	Anzahl Zyklen
DNS-Denaturierung	30 sec	95°C	<div style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin-right: 5px;"></div> x 16
DNS-Denaturierung	30 sec	95°C	
Primerhybridisierung	1 min	55°C	
Primerverlängerung	variabel	68°C	
Pause	unendlich	4°C	

Nach der Amplifikation wurden die Produkte für 1 h bei 37°C mit *DpnI* verdaut, um die methylierten, nicht-mutierten Templates zu fragmentieren. Anschließend wurde 1 µL der DNS zu kompetenten DH5α *E. coli* gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock (1 min, 42°C) und 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 500

$\mu\text{L}$  LB-Medium für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 750 UpM geschüttelt und 250  $\mu\text{L}$  auf Antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert.

## **2.10 Protein-biochemische und biophysikalische Methoden**

### **2.10.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus eukaryotischen Zellen**

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen trypsinisiert, in PBS gewaschen, in 100  $\mu\text{L}$  Zellyse-Puffer pro  $1 \times 10^6$  aufgenommen und 20-30 min auf einem Drehrad bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Mit Hilfe des im Puffer enthaltenen nichtionischen Detergenzes NP-40 (IGEPAL CA-630®, Sigma Aldrich) können sowohl viele lösliche Zellkernproteine als auch zytoplasmatische Proteine aus eukaryotischen Zellen herausgelöst werden. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 20 Minuten bei 13.000 UpM und  $4^\circ\text{C}$  wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt; die restlichen Zelltrümmer wurden verworfen. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels des BCA-Tests (s. 2.10.9). Die Lysate wurden zur Denaturierung in 5 x Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  aufgeköcht. Anschließend konnten die so erstellten Proteinlysate über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (s. 2.10.10) und Western Blot (s. 2.10.12) aufgetrennt und analysiert werden.

### **2.10.2 Zellfraktionierung (ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit)**

Mit Hilfe des ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits (Calbiochem-Merck) ist es aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit verschiedener subzellulärer Kompartimente in speziellen Reagenzien möglich, diese subzellulären Fraktionen voneinander zu trennen. Die strukturelle Integrität der verschiedenen Kompartimente bleibt hierbei vor und während der Extraktion erhalten. Im Verlauf der Zellfraktionierung mit Hilfe dieses Kits erhält man vier Fraktionen mit abnehmender Komplexität des Proteoms. Der Extraktions-Puffer I löst zytosolische Proteine (Fraktion 1), während Membranen und membranöse Organellen mit Hilfe des Extraktions-Puffers II gelöst werden (Fraktion 2). Anschließend erhält man durch die Behandlung mit Extraktions-Puffer III die nukleäre Fraktion (Fraktion 3), wohingegen Komponenten des Zytoskeletts erst ganz zum Schluss mit Hilfe von Extraktions-Puffer IV gelöst werden (Fraktion 4). Alle Puffer wurden frisch mit einem Protease Inhibitor Cocktail aus dem Kit

versetzt und dem Extraktions-Puffer III wurde zusätzlich noch Benzonase zugegeben. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Zellfraktionierung mit Hilfe des ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kits an verschiedenen rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> und WT MEF Zelllinien, sowie an Kontrollzellen durchgeführt. Hierbei wurden pro Ansatz jeweils 1 x 10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt und die Fraktionierung anhand der Angaben des Herstellers für adhärenzte Zellen durchgeführt. Nach der Zellfraktionierung wurden die vier verschiedenen Fraktionen mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese (s. 2.10.10) und Western Blot (s. 2.10.12) analysiert. Hierbei erfolgte auch eine Kontrolle der Reinheit der Fraktionen durch die Detektion bestimmter Marker-Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper.

### **2.10.3 Zellfraktionierung mit Hilfe der Zuckergradienten-Zentrifugation**

Mit Hilfe des Zuckergradienten werden zelluläre Bestandteile/Organelen auf der Basis ihrer Größe und Dichte durch Ultrazentrifugation aufgetrennt. Große und dichte Komponenten sedimentieren dabei am schnellsten.

#### **Herstellung des Sukrosergradienten**

Für die Trennung von Zellorganellen wurde ein 8 mL Sukrosegradient unter kontinuierlichem Mischen von zwei Sukroselösungen aus 0,8 und 2 M Sukrose mit Hilfe des FPLC Liquid Chromatography Mischsystems (GE Healthcare) hergestellt, dessen Dichte zum Röhrchenboden zunimmt.

#### **Herstellung von Zelllysaten und Durchführung der Zuckergradienten-Zentrifugation**

Mit 100 U/mL IFN- $\gamma$  vorstimulierte 5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden nach dem Trypsinisieren 2-mal mit eiskaltem Homogenisierungspuffer gewaschen und in 1,5 mL Homogenisierungspuffer mechanisch mit Hilfe eines Zell-Homogenisators aufgeschlossen. Danach wurde das Lysat 10 min bei 1.500 x *g* zentrifugiert, um die Zellkerne zu entfernen. Der postnukleäre Überstand (PNÜ) wurde auf einen 0,8-2M Sukrosegradienten aufgeschichtet. und bei 261.000 x *g* 16 h lang ultrazentrifugiert. Der Gradient wurde in 500  $\mu$ L Fraktionen über die Peristaltikpumpe (Heidolph) und den Fraktionssammler (GE Healthcare) von unten

aufgetrennt. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, die Fraktionen mit dem 5 x Auftragspuffer gemischt und bis zur SDS-PAGE-Gelelektrophorese (s. 2.10.10) und Western Blot Analyse (s. 2.10.12) bei -20°C gelagert.

#### **2.10.4 Expression und Isolierung von rekombinanten Proteinen aus bakteriellem Überexpressionssystem**

##### **Zellanzucht und -aufschluss**

Zur Zellanzucht wurde eine Vorkultur der, mit dem gewünschten Plasmid transformierten (s. 2.9.6), *E. coli* Bakterien des Rosetta Stammes im LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 30 µg/mL Chloramphenicol bei 37°C im Schüttelinkubator bei 180 UpM Ü/N angezogen. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:1000 im LB-Medium mit 100 mg/mL Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/mL) und 30 mg/mL Chloramphenicol (Endkonzentration 30 µg/mL) verdünnt und bei 37°C im Schüttelinkubator bei 180 UpM bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 1,0 kultiviert (LB-Medium als Blank). Die Überproduktion wurde durch Zugabe von 150-300 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen bei 4.000 x *g* und 4°C für 20 min zentrifugiert, mit Puffer A gewaschen, nach erneutem Zentrifugieren in 2,5 mL Puffer A pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Proben gleicher Zellzahl vor und nach der Induktion wurden für ein Kontrollgel abgenommen. Zum Zellaufschluss wurde der aufgetauten Bakteriensuspension 250 µM Pefabloc (Roth, Karlsruhe) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen unter Kühlung in drei Runden in einem Constant Cell Disruption System (Constant Systems Ltd, USA) bei einem Druck von 2,7 kbar aufgeschlossen. Alternativ erfolgte die Zellöffnung durch Ultraschall, dabei wurde die Ultraschallsonde direkt in die intensiv gekühlte Zellsuspension getaucht und Pulse von 30 bis 45 sec Dauer in 20 sec Intervallen erzeugt, um eine Wärmeentwicklung zu vermeiden. Nach Zentrifugation bei 100.000 x *g* und 4°C für 1 h wurde der Überstand dekantiert und weiterverarbeitet. Proben des Pellets und des Überstands wurden für ein Kontrollgel mit anschließender Coomassie-Färbung (s. 2.10.11) aufbewahrt.

### 2.10.5 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Zur affinitätschromatographischen Reinigung von N-terminal His<sub>6x</sub>-markierten Proteinen wurde der Überstand des Aufschlusses auf eine in Puffer A äquilibrierte Nickel-NTA-Superflow-Agarosesäule (Qiagen, Hilden) mit 25 mL Säulenvolumen bei einem Fluss von 1 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina Puffer A sowie 5 Säulenvolumina Puffer B gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte durch einen Imidazolgradienten von 10 mM bis 300 mM in 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM β-Mercaptoethanol (Gemisch aus Puffer B und Puffer C). Das Elutionsprofil wurde spektrophotometrisch durch Anregung bei 280 nm verfolgt. 5 µL der eluierten Proteinfraktionen wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen, in einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt (s. 2.10.10) und die Proteine durch Coomassie-Färbung (s. 2.10.11) visualisiert. Die Fraktionen mit der höchsten und reinsten Konzentration des gewünschten Proteins wurden vereinigt und durch Fällung oder Konzentrierung durch Zentrifugation (s. 2.10.6) angereichert und weitere Reinigungsschritte vorbereitet.

### 2.10.6 Proteinanreicherung

#### Präzipitation von Protein durch Ammoniumsulfat

Die Lösungseigenschaften von Proteinen können unter anderem durch Änderungen der Ionenstärke verändert werden. Durch Erhöhung der Salzkonzentration kann es wegen der Konkurrenz von Protein und Salz-Ionen um die solvatisierenden Wasser-Moleküle zum Aussalzen eines Proteins aus der Lösung kommen. In dieser Arbeit wurde Ammoniumsulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zum Fällen verwendet, weil es nur wenig Lösungswärme erzeugt und die ausgesalzene Proteine nicht denaturiert werden. Es wurde Ammoniumsulfat in einer Endkonzentration von 3 M zur Proteinlösung gegeben, die Lösung 20 min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert und anschließend das Protein 30 min bei 4.500 UpM pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 1% des Säulenvolumens der Gelfiltrationssäule im Puffer D resuspendiert.



### **Proteinanreicherung mittels Konzentratoren**

Eine Alternative zur Fällung stellt die Anreicherung des Proteins mit Hilfe von Konzentratoren dar, die durch eine Membran definierter Porengröße die Proteine nach molekularem Gewicht trennt. In dieser Arbeit wurde für die Anreicherung von mGBP2 und dessen Punktmutanten der Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Konzentrador mit der Ultracel-50 (Millipore) Membran (hält Proteine über 50 kDa fest) verwendet. Die Proteinlösung nach der Affinitätsreinigung wurde bei 4.000 UpM und 4°C bis zum Volumen von 3-4 mL konzentriert und dabei im Puffer D für die anschließende Größenausschluss-Chromatographie umgepuffert. Eine zu starke Einengung des Proteins (> 50 mg/mL) kann zu dessen Aggregation führen. Daher wurden die Proben zwischen den Zentrifugationsrunden immer wieder durch eine Pasteurpipette aufgewirbelt. Um schlussendlich das lösliche Protein von Aggregaten zu trennen, wurde die Probe für 20 min bei 100.000 x *g* und 4°C zentrifugiert und nur der Überstand weiterverwendet.

#### **2.10.7 Größenausschluss-Chromatographie**

Zur analytischen und präparativen größenspezifischen Trennung von Proteinen wurden Größenausschluss-Chromatographien durchgeführt. Zur präparativen Gelfiltration wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare) und zur analytischen Gelfiltration eine Superdex 200 HR 10/30 SEC Säule (GE Healthcare) verwendet. Die Säulen wurden vor den Läufen mit einem Säulenvolumen Puffer D ( $\pm$  Nukleotid) äquilibriert. Die eingesetzten Nukleotidkonzentration orientierten sich an den durch Affinitätsanalysen ermittelten Nukleotidbindungskonstanten des WT Proteins (s. 2.10.16). Zur Ermittlung des Übergangszustandes von mGBP2 wurde GDP in einer Konzentration von 50  $\mu$ M, Natriumfluorid in einer Konzentration von 10 mM und Aluminiumtrichlorid in einer Konzentration von 300  $\mu$ M zusammengemischt. Mit dieser Lösung wurde sowohl die Säule äquilibriert als auch das Protein 15 min auf Eis inkubiert. Das Protein wurde bei einem Fluss von 0,5 mL/min aufgetragen und das Elutionsprofil spektrophotometrisch durch Anregung bei 280 nm verfolgt. 5  $\mu$ L der eluierten Proteinfractionen wurden für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese verwendet (s. 2.10.10). Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung (s. 2.10.11) visualisiert. Zu präparativen Zwecken wurden die Fraktionen mit der höchsten und reinsten Konzentration des Zielproteins vereinigt, in einem Konzentrador (MWCO 50 kDa, s. 2.10.6) angereichert und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt (s. 2.10.9). Anschließend wurde das Protein in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bei der analytischen Größenausschluss-Chromatographie wurden die eluierten Proben in der nativen SDS-PAGE-Gelelektrophorese eingesetzt (s. 2.10.10), um den Oligomerisierungszustand der Proteine zu untersuchen. Alternativ wurde der Oligomerisierungsgrad mittels SEC-multi-angle light scattering (SEC-MALS) untersucht (s. 2.10.8).

### **2.10.8 Bestimmung des Oligomerisierungszustandes mittels Multi-Winkel-Licht-Streuung (SEC-MALS)**

SEC-MALS Experimente wurden mittels einer analytischen Superdex 200 10/300 Säule (GE Healthcare) an der Äkta-Purifier FPLC-Apparatur (GE Healthcare) durchgeführt, die mit einem Drei-Winkel-Lichtstreuungsdetektor (miniDAWN™ TREOS, Wyatt Technology), gefolgt von einem „differential refractive index detector“ (Optilab® rEX, Wyatt Technology) verbunden war. Die Säule wurde mit einem Säulenvolumen Puffer D vorher äquilibriert. 100  $\mu\text{L}$  des gereinigten Proteins nach der analytischen Größenausschluss-Chromatographie ohne und mit verschiedenen Nukleotiden wurden auf die Säule geladen. Die Daten wurden mit dem ASTRA Programm (Wyatt Technology) mit freundlicher Unterstützung von Dr. Britta Tschapek vom Institut für Biochemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf analysiert.

### **2.10.9 Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels des BCA-Tests**

Über einen BCA-(Bicinchoninsäure) Test (Smith et al., 1985) können unbekannte Proteinkonzentrationen kolorimetrisch quantifiziert werden. Die BCA-Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und eine geringe Störanfälligkeit gegenüber Detergenzien aus. Allerdings können komplexierende und reduzierende Verbindungen die Reaktion stören. Der Nachweis von Proteinen über einen BCA-Test beruht auf der Tatsache, dass die in der Probe enthaltenen Proteine, spezifisch die Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan, in einem alkalischen, wässrigen und kupferhaltigen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  reduzieren können (Biuret-Reaktion). Das einwertige Kupferion bildet nun nachfolgend mit zwei Molekülen BCA einen Farbstoffkomplex. Durch eine photometrische Messung bei 562 nm (Absorptionsmaximum des Komplexes) kann mit

Hilfe einer durch einen Standard (BSA) ermittelten Eichkurve die Proteinkonzentration in den zu testenden Proben ermittelt werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde der BCA-Test mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Für Western Blot Analysen wurden 20-40 µg Protein eingesetzt.

### **Konzentrationsbestimmung von Proteinen durch Absorptionsspektroskopie**

Proteine lassen sich spektrophotometrisch durch eine  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorption aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm nachweisen. Diese Methode eignet sich zur Konzentrationsbestimmung bei reinen Protein-Lösungen oder wenn nur wenig Protein vorhanden ist und es nicht denaturiert werden soll. Das Lösungsmittel diene zur Kalibrierung des Photometers, um die Hintergrundabsorption zu eliminieren. Die Reinheit der Protein-Lösung konnte über den Quotienten der Absorption bei 280 nm und 260 nm bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. Der Absorptionskoeffizient von mGBP2 wurde nach der Methode von (Gill and von Hippel, 1989) bestimmt ( $43.485 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Das Protein wurde anschließend im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.10.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das stark an hydrophobe Bereiche von Proteinen gebunden wird (1 g Protein bindet 1,4 g SDS) und diese denaturiert. Dabei wird eine stark negative Ladung eingefügt, die alle vorhandenen Ladungen der Proteine überdeckt. Aus diesem Grund wandern die linearen Protein-SDS-Komplexe während der Elektrophorese ausschließlich zur Anode und verhalten sich im elektrischen Feld unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung der Proteine und ihren isoelektrischen Punkten. Aufgrund der Molekularsiebeigenschaften eines Polyacrylamidgels ist die Mobilität der Proteine eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molmassen. Somit kann die relative Molmasse eines Proteins anhand eines Protein-Standards ermittelt werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden Proteine über 4-12% Bis-Tris-Gradientengele der Firma Invitrogen und über selbstgegossene 10% Tris-Gele aufgetrennt. Dabei wurden die denaturierten Proben in die Taschen des Gels geladen und bei 120-170 V in jeweiligem Laufpuffer aufgetrennt. Für die spätere Bestimmung der relativen Molmasse der Proteine wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker

(PageRuler™ Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas oder High-Range Rainbow, GE Healthcare) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte so lange, bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau die untere Grenze des Gels erreicht hatte. Die Geltaschen wurden mit Malachitgrün markiert.

### **2.10.11 Coomassie-Blau-Färbung von Protein-Gelen**

Zur raschen Sichtbarmachung der durch eine SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurde die Coomassie-Blau-Färbung angewendet. Als Farbstoff diente für Kontrollgele Coomassie R-250 und bei Gelen, die für eine massenspektrometrische Analyse vorbereitet wurden, Coomassie G-250. Beide Farbstoffe lagern sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren an und färben alle Proteine unspezifisch an, wobei Coomassie G-250 empfindlicher ist.

#### **Konventionelle Coomassie R-250-Färbung**

Bei dieser Färbung wurden die Proteine in Coomassie R250-haltiger Lösung Ü/N gefärbt. Am nächsten Tag erfolgte eine mehrstündige Entfärbung in Entfärbelösung und die Gele wurden anschließend für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

#### **Kolloidale Coomassie G-250-Färbung**

Die Gele wurden zunächst für 30 min mittels 2% (v/v) Phosphorsäure in 50% (v/v) Ethanol-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Gele in der Färbelösung mit Aluminiumsulfat und Coomassie G-250 für 1 h geschwenkt. Nach der Färbung wurden die Gele in ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

### **2.10.12 Western Blot (Immunoblot)**

Die Technik des Western Blottings besteht seit 1979 (Towbin et al., 1979; Renart and Sandoval, 1984) und dient dazu, die in einem Gel aufgetrennten Proteine über einen Transfer (z.B. Elektrotransfer) auf einen Träger (z.B. Nitrocellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membran) zu übertragen und für die nachfolgende Immundetektion mittels spezifischer Antikörper zu immobilisieren. Im Anschluss an eine SDS-PAGE-

Gelelektrophorese (s. 2.10.10) erfolgte der Elektrotransfer der auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit dem Transfergerät Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Dafür wurden das Gel, die Membran und das Filterpapier (Whatman 3 MM) kurz im Transferpuffer mit 20% Methanol äquilibriert. Danach wurden auf die mit Transferpuffer befeuchtete Anoden-Graphitplatte die Komponenten folgendermaßen luftblasenfrei geschichtet:

1. 1 Lage Whatmanpapier
2. Membran
3. SDS-Gel
4. 1 Lage Whatmanpapier

Die Transferzeit betrug 2 h bei 40 mA pro Gel. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT in 5% Magermilchpulver oder in 5% BSA mit 0,2% NaN<sub>3</sub>, jeweils gelöst in TBS-T, blockiert, um eine unspezifische Proteinbindung des Antikörpers zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde in 3% Milchpulverlösung oder 5% BSA nach Angaben des Antikörperherstellers verdünnt und Ü/N bei 4°C mit der Membran bei leichtem Schütteln in eingeschweißten Tüten oder langsamem Rollen in Falcon-Röhrchen inkubiert. Nachdem die Membran dreimal für jeweils 5 min in TBS-T gewaschen worden war, um unspezifisch gebundenen primären Antikörper zu entfernen, erfolgte anschließend die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten und ebenfalls in 3% Magermilchpulver-TBS-T gelöstem sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in TBS-T bei RT gewaschen. Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers und somit des Proteins von Interesse erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (GE Healthcare). Die Membran wurde mit der Detektionslösung (bestehend aus gleichen Teilen der Lösungen A und B) im Dunkeln benetzt, 3 min inkubiert und anschließend in eine Plastikfolie gelegt. Die spezifischen Signale wurden durch Exposition und Entwicklung der, durch Chemolumineszenz belichteten, speziellen Filme (ECL Hyperfilm, GE Healthcare) detektiert.

### 2.10.13 Analyse von Lipid-Protein-Interaktionen

Im Verlauf dieser Arbeit wurde getestet, ob mGBP2 mit Lipiden interagieren kann. Dazu wurden die „Membrane Lipid Strips®“ (Echelon) mit Lysaten aus verschiedenen rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEF Zelllinien inkubiert. Das Prinzip dieser Analyse beruht

auf der Bindung des Proteins an die auf der hydrophoben Membran punktförmig aufgetragenen biologisch aktiven Lipide (z.B. Phosphoinositide). Im Falle der „Membrane Lipid Strips®“ sind pro Lipidpunkt 100 pmol Lipid aufgebracht. Für die Durchführung der Lipid-Protein-Interaktionsanalysen wurden pro Ansatz jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen in 12 mL hypotonischem Lysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und mit Hilfe einer Spritze und Kanüle mechanisch aufgeschlossen, indem die Zellsuspension mehrfach durch die Kanüle gepresst wurde. Alternativ wurde ein Zell-Homogenisator (Potter) verwendet. Anschließend wurde das Lysat für 1 h bei 4°C und  $100.000 \times g$  ultrazentrifugiert, um die zytosolische Fraktion zu gewinnen. Währenddessen wurden die Lipid-Membranen für mindestens 1 h bei RT in 3% BSA-TBS-T blockiert, wobei vorher getestet wurde, dass das verwendete BSA keine Fettsäuren enthielt. Die blockierten Lipid-Membranen wurden mit den Lysaten (1:1-Verdünnung mit Blockierlösung) Ü/N bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nachfolgend wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen, für 1 h bei RT oder länger bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert und nochmals jeweils 10 min in TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurden die Membranen ebenfalls für 1 h bei RT mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und nach einem weiteren Waschvorgang für drei Minuten mit der ECL-Detektionslösung benetzt. Die Signale wurden wie in Abschnitt 2.10.12 beschrieben detektiert.

#### 2.10.14 Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Proteininteraktionen der mGBPs wurde die Methode der Immunpräzipitation angewendet. Hierfür wurden GFP-mGBP2 bzw. GFP stabil exprimierende NIH 3T3 oder mGBP2<sup>-/-</sup> bzw. WT MEF Zellen oder HA-mGBP2 bzw. den Leervektor stabil exprimierende NIH 3T3 oder mGBP2<sup>-/-</sup> MEF Zellen in Kultur genommen. Zur Detektion von Homodimeren von mGBP2 wurden das HA-Konstrukt exprimierende Zellen zusätzlich mit dem FLAG-mGBP2 Konstrukt transfiziert (s. 2.8.6). Zellen wurden Ü/N mit 100 U/mL IFN- $\gamma$  stimuliert, um die endogene GTPasen Expression zu induzieren. Nach 16 h wurden  $2-3 \times 10^6$  Zellen in 12 mL Lysepuffer lysiert und für 20 min auf einem Drehrad bei 4°C rotiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 13.000 UpM wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und der Präzipitationsantikörper in einer Verdünnung von 1:20 zum Probenvolumen zugegeben und Ü/N bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst die Protein-G-Sepharose (GE

Healthcate) 3-mal mit Lysepuffer bei 4.500 UpM gewaschen, pro Ansatz 60  $\mu$ L Protein-G-Sepharose zu den Lysaten gegeben und für 4 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Bei direkt an Agarose koppelten Antikörpern, wurde die Agarose 3-mal mit Lysepuffer bei 4°C und 4.500 UpM gewaschen, pro Ansatz 60  $\mu$ L Antikörper gekoppelte Agarose zu den Lysaten gegeben und Ü/N bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben bei 4°C und 4.500 UpM zentrifugiert, der Überstand abgenommen und als Reserve bei -20°C aufbewahrt. Nach viermaligem Waschen mit Lysepuffer bei 4°C und 4.500 UpM wurde das Pellet vollständig trocken gesaugt und mit 40-60  $\mu$ L 5 x Auftragspuffer versehen. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht, anschließend für 2 min bei 13.000 UpM zentrifugiert und der Überstand erneut in ein frisches Gefäß überführt. Es wurden je 20  $\mu$ L Probe auf ein SDS-Gel (4%-12%) aufgetragen und, wie unter 2.10.12 beschrieben, ein Western Blot durchgeführt. Zum Proteinnachweis wurden die Proteine mit diversen anti-mGBP Antikörpern (aus Kaninchen), sowie mit den anti-GFP (aus Maus), anti-HA (aus Maus oder Kaninchen) und anti-FLAG (aus Maus) Antikörpern Ü/N inkubiert. Nach drei 5 minütigen Waschrunden in TBS-T wurden die Nitrocellulose-Membranen mit den entsprechenden an HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert, und nach einem weiteren Waschvorgang (3 mal 10 min in TBS-T) für drei Minuten mit der ECL-Detektionslösung benetzt. Die Signale wurden wie in Abschnitt 2.10.12 beschrieben detektiert.

### **2.10.15 Analyse von Nukleotiden mittels reversed-phase HPLC**

Die Analyse wurde nach (Lenzen et al., 1995) durchgeführt. Das Prinzip der Trennung von Nukleotiden mittels der reversed-phase HPLC beruht auf der Interaktion der hydrophoben stationären Phase der Säulenmatrix mit den Ionenpaaren aus Nukleotid und Tetrabutylammoniumbromid in der mobilen Phase. Je nach Anzahl der Phosphatgruppen binden die Nukleotide unterschiedlich viele Tetrabutylammoniumbromid-Ionen, wodurch die Retentionszeiten erhöht werden. Die Probe wurde bei einem Fluss von 1 mL/min auf die HPLC-Anlage (Agilent Technologies, Merck-Hitachi) durch Einspritzen aufgetragen und über eine reversed-phase C18 Säule (Supelco, Sigma-Aldrich) aufgetrennt. Die denaturierten Proteine wurden an einer LiChrospher 100 RP-18-Vorsäule (Merck) adsorbiert. Der Laufpuffer enthielt 10 mM Tetrabutylammoniumbromid, 0,2 mM Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), 100 mM Kaliumphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 6,5 mit 2% (v/v) Acetonitril. Die Detektion der Signale erfolgte

durch Messung der Absorption bei 254 nm. Als Absorptionskoeffizient wurde für Guaninnukleotide  $13.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  verwendet. Das jeweilige Nukleotid wurde durch das Auftragen von Standards bekannter Nukleotidart und -menge identifiziert.

### 2.10.16 Fluoreszenztitrationsen

Die Gleichgewichtstitrationsen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von mant-Nukleotiden von mGBP2 erfolgten an einem Fluorolog Spektrofluorimeter (HORIBA Jobin Yvon) in QS 10.00 Fluoreszenzküvetten bei 25°C. Die Messungen wurden im Puffer D durchgeführt. Die Anregung des mant-Fluorophors erfolgte bei 355 nm und einer Schlitzbreite von 0,35 mm, die Emission wurde bei 448 nm und einer Schlitzbreite von 1 mm gemessen. Zu einer Lösung von 0,5  $\mu\text{M}$  mant-Nukleotid wurde schrittweise die Lösung von mGBP2 gegeben, die das mant-Nukleotid in identischer Konzentration enthielt. Nach Einstellung des Gleichgewichts wurde die Fluoreszenz gemessen und gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. An die Daten wurde eine quadratische Bindungskurve gemäß Gleichung 2.1 angepasst (Herrmann and Nassar, 1996).

$$\text{Gl. 2.1: } F = F_0 + \Delta F_{max} \cdot \frac{[E]_0 + [L]_0 + K_D - \sqrt{([E]_0 + [L]_0 + K_D)^2 - 4 \cdot [E]_0 \cdot [L]_0}}{2[E]_0}$$

Dabei ist  $F$  die Gesamtfluoreszenz,  $F_0$  die Grundfluoreszenz,  $\Delta F_{max}$  die maximale Fluoreszenzerhöhung,  $[E]_0$  die Gesamtkonzentration des vorgelegten Reaktionspartners,  $[L]_0$  die Gesamtkonzentration des zugegebenen Reaktionspartners und  $K_D$  die Dissoziationskonstante. Diese Anpassung liefert die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation  $K_D$ . Die Gleichungen wurden auf der Webseite <http://blog.alexander-fischer.org/internetantes/online> hergestellt.

### 2.10.17 Langsame Reaktionskinetik

Die Hydrolyse von Nukleotiden durch mGBP2 bei mehrmaligem Umsatz wurde mit reversed-phase HPLC verfolgt (s. 2.10.15). Dazu wurde mGBP2 im Puffer D mit 1 mM GTP bzw. GDP bei 37°C inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden 20  $\mu\text{L}$  des Ansatzes mit einer Hamilton-Pipette wie in 2.10.15 beschrieben auf eine HPLC-Anlage aufgetragen und die Nukleotide aufgetrennt. Die Änderung der Nukleotidkonzentration wurde als Funktion der Reaktionszeit aufgetragen und die Anfangsgeschwindigkeiten im



Bereich bis 60% Substratumsatz (unter Berücksichtigung der Produktinhibition, Schwemmlé and Staeheli, 1994) durch lineare Regression bestimmt. Der Quotient aus der Anfangsgeschwindigkeit und der Proteinmenge lieferte die spezifische Aktivität. Zur Bestimmung der Kooperativität der Hydrolyse wurde die Änderung der spezifischen Aktivität als Funktion der Proteinkonzentration aufgetragen. An die Daten wurde eine quadratische Bindungskurve gemäß Gleichung 2.2 angepasst, die eine Dimerisierung beschreibt.

$$\text{Gl. 2.2: } k = k_0 + \Delta k_{max} \cdot \frac{2[E] + K_D - \sqrt{(2[E] + K_D)^2 - 4 \cdot [E]^2}}{2[E]}$$

Dabei ist  $k$  die spezifische Aktivität bei der Enzymkonzentration  $E$  in M,  $k_0$  die spezifische Aktivität bei unendlich hoher Verdünnung von  $E$ , also die intrinsische GTPase-Aktivität,  $\Delta k_{max}$  die maximale Erhöhung der spezifischen Aktivität und  $K_D$  die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation des Dimers in M. Diese Anpassung liefert die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation  $K_D$  des Dimers und den Wert für die maximale spezifische Aktivität in  $\text{min}^{-1}$ .

## 2.11 Computerprogramme

### 2.11.1 Klonierungsstrategien

Strategien zur Klonierung von Expressions- und Rekombinationsvektoren wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI Advance™ von Invitrogen erstellt.

### 2.11.2 Sequenzvergleiche

Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen SeqMen von DNASTar und Vector NTI Advance™ von Invitrogen oder mit der ClustalW Software durchgeführt.

### 2.11.3 Modellerstellung und Strukturvisualisierung

Das Modell von mGBP2 wurde mit dem SWISS-MODEL Programm ([swissmodel.expasy.org](http://swissmodel.expasy.org)) erstellt und mit der 3D Viewer Software (Invitrogen) visualisiert.

#### **2.11.4 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung von Daten wurde das Programm GraphPad Prism® 5 verwendet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Standard t-Tests für gepaarte Daten. Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aufgeführt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen wurden als signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$  gegeben war, das heißt wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% lag.

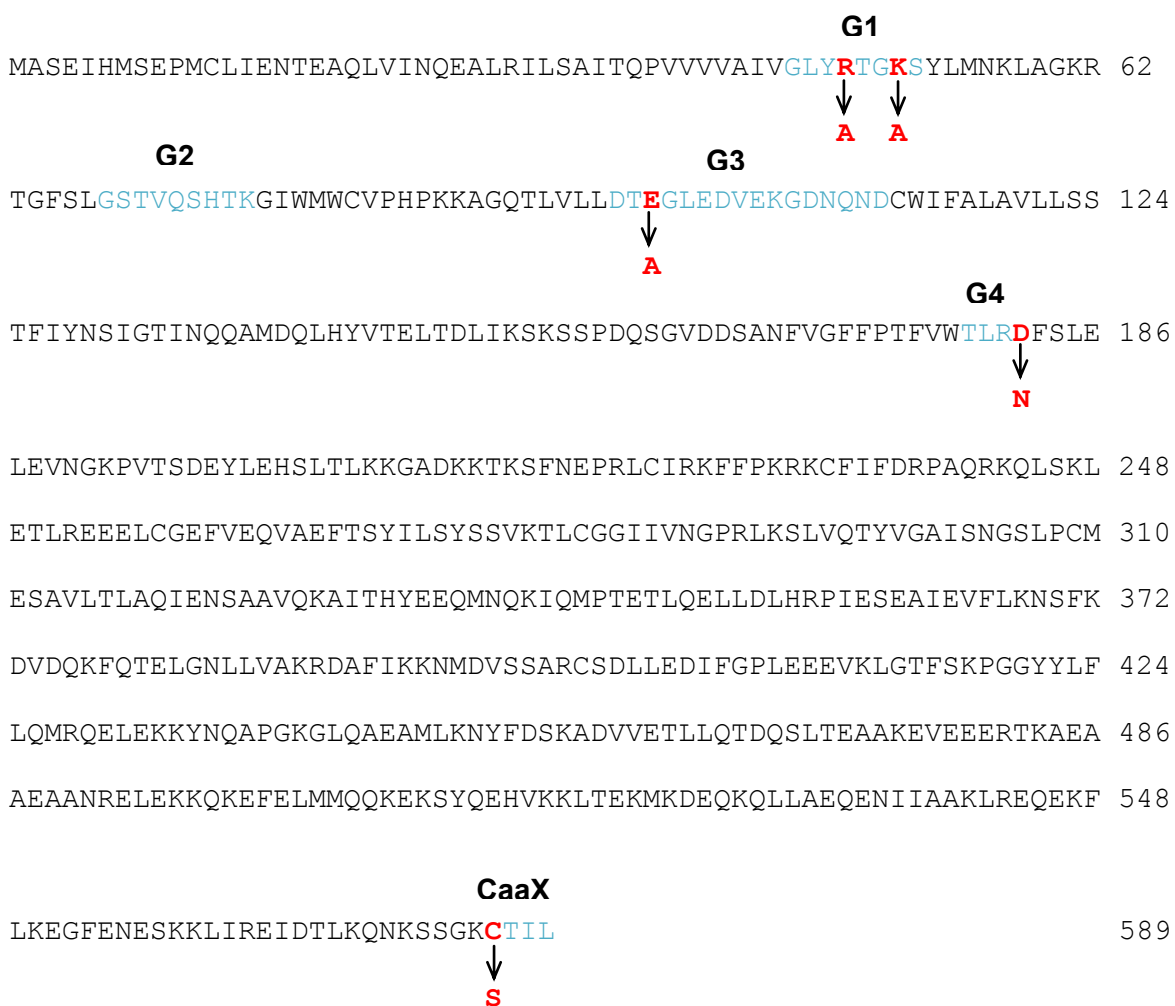
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Überblick

Im Zuge der vorangegangenen Expressionsstudien konnten mGBPs als durch IFN- $\gamma$  hoch induzierbare Transkripte identifiziert werden (Boehm et al., 1998; Degrandi et al., 2007). Weiterhin konnte die Expression dieser Gene nach IFN- $\gamma$  Stimulation *in vitro* und nach Infektion *in vivo* auf Proteinebene nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2007). Diese Arbeit widmet sich der Charakterisierung der biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften eines Mitglieds dieser Dynamin-verwandten GTPasen Familie, mGBP2, mit dem Ziel, Zusammenhänge zwischen Aktivität, intrazellulärer Lokalisation und biologischer Funktion im Kontext der zellulären Immunabwehr gegen den Parasiten *T. gondii* zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden Punktmutationen in den konservierten Motiven der N-terminalen GTPase-Domäne von mGBP2 und zusätzlich in der Signalsequenz für C-terminale Isoprenylierung eingeführt (Abb. 3.1). Die Punktmutationen wurden analog zu den für hGBP1 beschriebenen GTP-Bindungs- und Hydrolysemutanten hergestellt, da hGBP1 mit 68% Sequenzidentität mit mGBP2 das nächste humane Ortholog ist (Praefcke et al., 2004; Kravets et al., 2012). In der P-Schleife (<sub>45</sub>GX4GKS/T<sub>52</sub>) wurden die Aminosäuren Arginin 48 (R48) und Lysin 51 (K51) jeweils zu Alanin, im Switch II Motiv (<sub>97</sub>DXXG<sub>100</sub>) die Glutaminsäure 99 (E99) ebenfalls zu Alanin und im G4 Motiv (<sub>179</sub>TLRD<sub>182</sub>) die Asparaginsäure 182 (D182) zu Asparagin mutiert. In der Isoprenylierungssequenz (<sub>586</sub>CaaX<sub>589</sub>) wurde das C-terminale Cystein 586 (C586) gegen ein Serin ausgetauscht. Durch Mutation dieser Lipidkonjugation kann die Isoprenylierung verhindert werden (Vestal et al., 2000). Die Ergebnisse der Experimente sollten die biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften von mGBP2 gezielt aufklären und die Funktion von mGBP2 mit dem Strukturmodell (Abb. 3.2) verbinden.

Das Arginin an der Position 48 ist ausschließlich innerhalb der GBP Familie und in den Atlantinen konserviert (Herrmann and Nassar, 1996; Praefcke et al., 2004). Anhand der biochemischen Daten für hGBP1 sollte diese Aminosäure eine Rolle bei der GTP-Hydrolyseaktivität und bei der Stabilisierung der nukleotidabhängigen Oligomere, in Form des in der Literatur beschriebenen „Arginin-Fingers“ spielen (Prakash et al., 2000b; Praefcke et al., 2004; Ghosh et al., 2006). Das ebenfalls in der P-Schleife lokalisierte Lysin 51 sollte voraussichtlich über seine positiv geladene Seitenkette mit den negativen Ladungen des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphats interagieren und damit sowohl für die

Nukleotidbindung, als auch für die kooperative GTP-Hydrolyse essentiell sein. Außerdem ist es in hGBP1 in zahlreichen Interaktionen mit der Switch II Region involviert (Prakash et al., 2000a; Vetter and Wittinghofer, 2001; Abdullah et al., 2009). Die flexible Switch II Region wird bei hGBP1 starken strukturellen Veränderung im Zuge der Hydrolysereaktion unterworfen (Knudsen et al., 2001). In Analogie zu hGBP1 könnte diese Region in mGBP2, aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum aktiven Zentrum, den Übergangszustand stabilisieren und die Spaltung der Phosphatgruppen in Folge einer Konformationsänderung beschleunigen. Die Mutation an der Position 99 in diesem Motiv bewirkt eine deutlich verringerte Hydrolyserate bei hGBP1 (Praefcke et al., 2004). Asparaginsäure 182 aus dem G4 GTP-Bindungsmotiv, sollte die Spezifität des Proteins für Guaninnukleotide bestimmen. Eine Mutation dieser Aminosäure zu Asparagin führt bei anderen GTP-bindenden Proteinen zu einer Änderung der Bindungsspezifität von Guanin- zu Xanthinnukleotiden (Praefcke et al., 1999, Abb. 3.1).

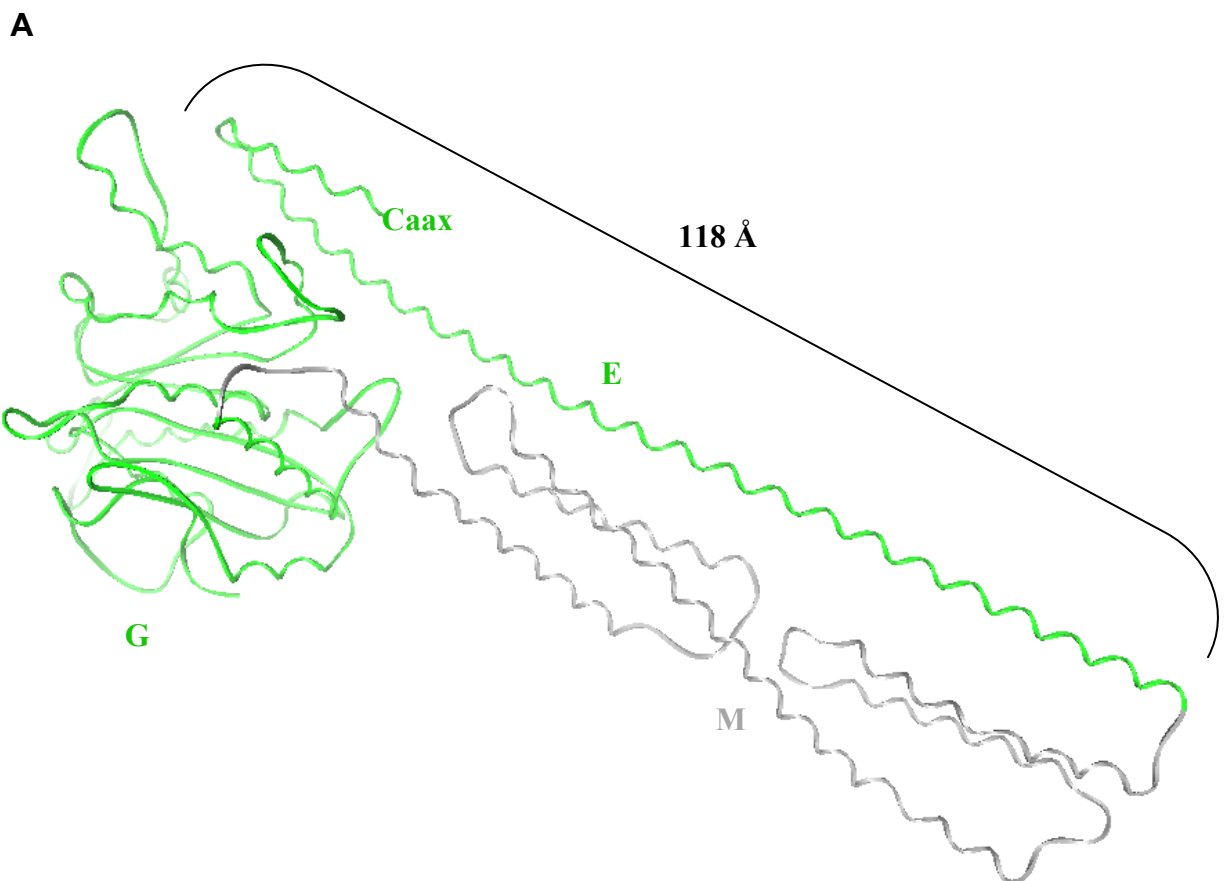


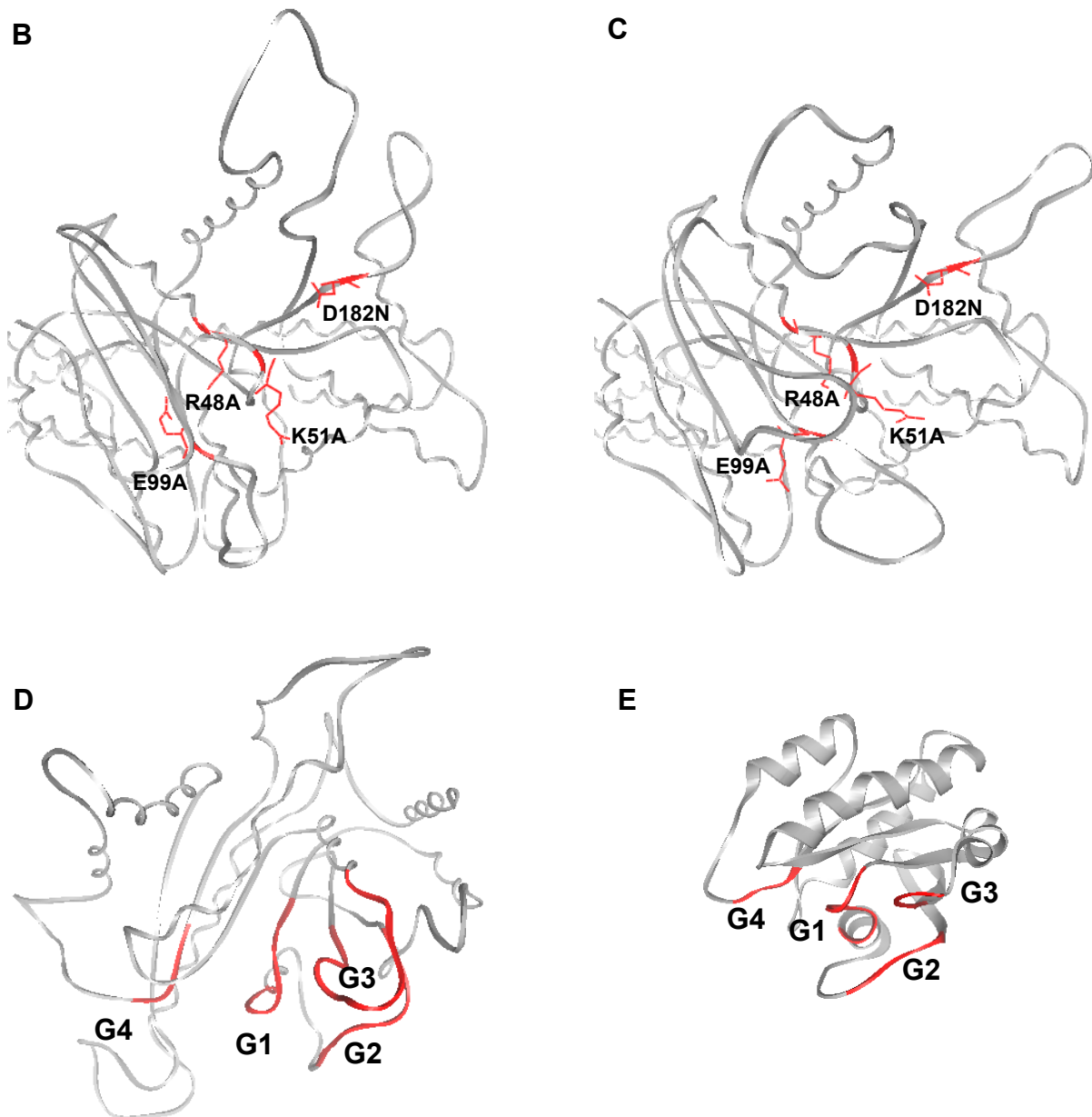
**Abb. 3.1: Aminosäure-Sequenz von mGBP2.**

Die konservierten Motive G1-G4 in der GTPase-Domäne und im Isoprenylierungsmotiv (CaaX) von mGBP2 sind herausgehoben (blau). Die eingeführten Mutationen sind rot markiert.

### 3.2 Strukturmodelle von mGBP2

Dreidimensionale Strukturmodelle von mGBP2, die anhand der vorhandenen Kristallstrukturen des homologen Proteins hGBP1 (PDB Einträge 1DG3, Prakash et al., 2000a; 2BC9, Ghosh et al., 2006) aufgestellt wurden, sollten es ermöglichen, die biochemischen Eigenschaften auf molekularer Ebene zu interpretieren. Ein Strukturmodell kann einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus der GTP-Hydrolyse liefern. So können im Modell ohne Nukleotid (Abb. 3.2 A) die Domänen von mGBP2 visualisiert werden. Die Position der, in dieser Arbeit beschriebenen, Aminosäuren in der G-Domäne, sowie ihre jeweilige Positionsänderungen in Abhängigkeit von der Nukleotidbindung können ebenfalls in Strukturmodellen verfolgt werden (Abb. 3.2 B, C).





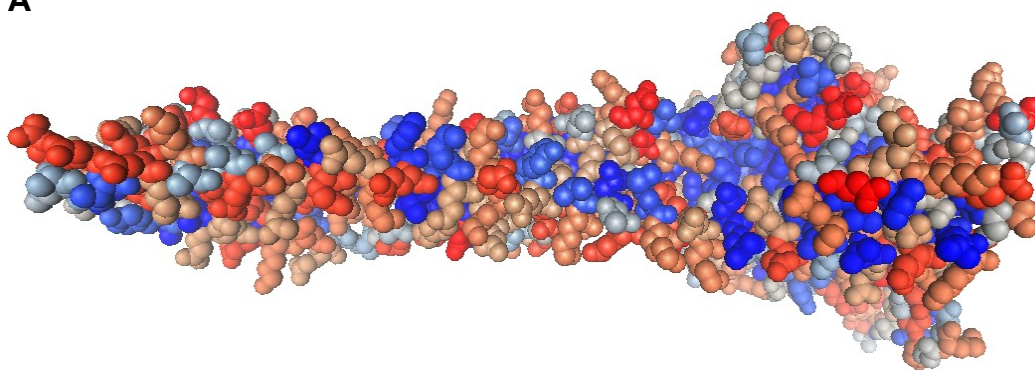
**Abb. 3.2: Strukturmodelle von mGBP2.**

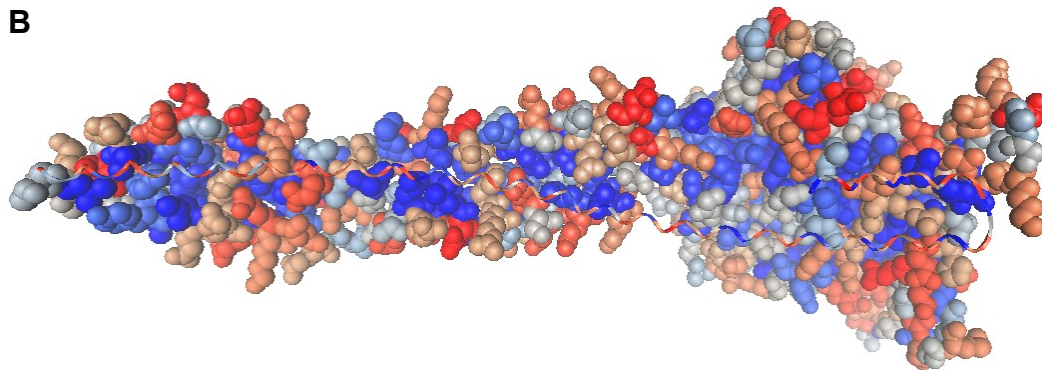
Bänderdarstellung der Strukturmodelle von mGBP2 (SWISS-MODEL). Die GTPase- (G) und die GED- (E) Domänen sind grün und die mittlere (M) Domäne ist grau dargestellt (A). Die aus den hGBP1 Kristallstrukturen 1DG3 (ohne Nukleotid) und 2BC9 (mit GppNHp) abgeleiteten räumlichen Positionen der in der G-Domäne mutierten Aminosäuren in den konservierten Motiven G1-G4 (R48, K51 in G1, E99 in G2 und D182 in G4) ohne Nukleotid (B) und mit gebundenem GppNHp (hier nicht dargestellt) sind rot markiert (C). Die G-Domäne von mGBP2 besteht aus einem achtsträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das von neun  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Die Motive G1-G4 sind rot hervorgehoben (D). Zum Vergleich ist die GTPase-Domäne von H-Ras mit den konservierten Sequenzen dargestellt (PDB Eintrag 5p21; (Pai et al., 1989) (E).

Das Strukturmodell ohne Nukleotid umfasst die Aminosäurereste 6 bis 577. Die Abbildung 3.2 A zeigt die Sekundärstrukturelemente in der Bänderdarstellung. Das Molekül besteht aus der N-terminalen globulären GTPase-Domäne (G), einer gestreckten rein  $\alpha$ -helikalen Mitteldomäne mit zwei Bündeln aus je drei Helices (M), von denen eine

an beiden Bündeln beteiligt ist, und einer C-terminalen sogenannten GTPase-Effektor Domäne (GED, hier E genannt). Die E-Domäne ist eine 118 Å lange  $\alpha$ -Helix, die an den anderen beiden Domänen entlang läuft und nach einer Kehre in eine weitere kürzere Helix übergeht. Die letzten elf Aminosäuren des Proteins konnten nicht dargestellt werden, weil die korrespondierenden Aminosäuren in der hGBP1 Struktur (PDB Eintrag 1DG3) nicht aufgelöst wurden. Sie enthalten unter anderem die Erkennungssequenz für die Geranylgeranylierung des Proteins in der CaaX-Box (Abb. 3.2 A).

Für die G-Domäne von mGBP2, die aufgrund ihrer Größe auch als Large GTPase (LG) bezeichnet wird, weil sie bei ähnlicher Topologie um über 100 Aminosäuren größer als die GTPase-Domäne von Ras ist, wird ein achtsträngiges  $\beta$ -Faltblatt, umgeben von neun  $\alpha$ -Helices vorhergesagt (Abb. 3.2 D), wohingegen Ras sechs  $\beta$ -Faltblattstränge und fünf  $\alpha$ -Helices aufweist (Abb. 3.2 E). Man erkennt, dass die G-Domäne den Kontakt mit der C-terminalen Helix der E-Domäne herstellt, die Domänen kommen sich dabei bis auf 4,5 Å nah (Abb. 3.2 A). Der Abstand zwischen der C-terminalen Helix und dem aktiven Zentrum beträgt jedoch etwa 35 Å. Die P-Schleife in mGBP2 umfasst die Seitenketten 45 bis 52, die Switch I Region die Aminosäuren 68 bis 76, die Switch II Region erstreckt sich über die Aminosäuren 97 bis 113 und das G4 Motiv umfasst die Seitenketten 170 bis 182 (Abb. 3.2 D). Die Bündel der M-Domäne werden wahrscheinlich durch hydrophobe Kontakte zwischen den Helices zusammengehalten. Die Außenseite der Helices der E-Domäne ist erheblich weniger geladen als die von ihnen bedeckte Oberfläche der G- und M-Domänen, wie in Abbildung 3.3 gezeigt ist. Durch eine Konformationsänderung bedingte Loslösung dieser Domäne vom Rest des Proteins würde also weder eine hydrophobe Oberfläche dem Lösungsmittel exponieren noch eine große Anzahl von Bindungen aufbrechen. Die E-Domäne stellt daher einen guten Kandidaten für eine Interaktionsfläche mit anderen Proteinen dar (Dissertation G. Praefcke, 2001).

**A**



**Abb. 3.3: Wechselwirkungen der E- mit den G- und M-Domänen von mGBP2.**

Die Oberfläche des Proteins ist entsprechend ihres elektrostatischen Potentials gefärbt, wobei blau für positive und rot für negative Ladung steht (Nicholls et al., 1991; Dissertation G. Praefcke, 2001) (A). Im unteren Bild sind die Helices der E-Domäne in Spiralforn dargestellt, um die hydrophile und geladene Oberfläche darunter zu zeigen (B). Das mGBP2 Molekül ist in beiden Abbildungen in der gleichen Ebene dargestellt.

Die gesamte Topologie von mGBP2 entspricht Strukturvorhersagen, die für Dynamin und Mx getroffen wurden. Bei beiden Proteinen wurde eine Interaktion der E-Domäne mit der M-Domäne und der G-Domäne gezeigt (Haller and Kochs, 2002; MacMicking, 2004; Praefcke and McMahon, 2004). Darüber hinaus stellen Sekundärstrukturen der jeweiligen M- und E-Domänen in beiden Proteinen  $\alpha$ -Helices oder Helixbündel dar (Chappie et al., 2010; Gao et al., 2010). Da auch die Größen dieser Domänen in Dynamin und Mx denen in mGBP2 ähnlich sind, könnte das Strukturmodell von mGBP2 trotz der geringen Homologie der Primärsequenz zu diesen beiden Proteinfamilien repräsentativ für die ganze mGBP Familie sein.

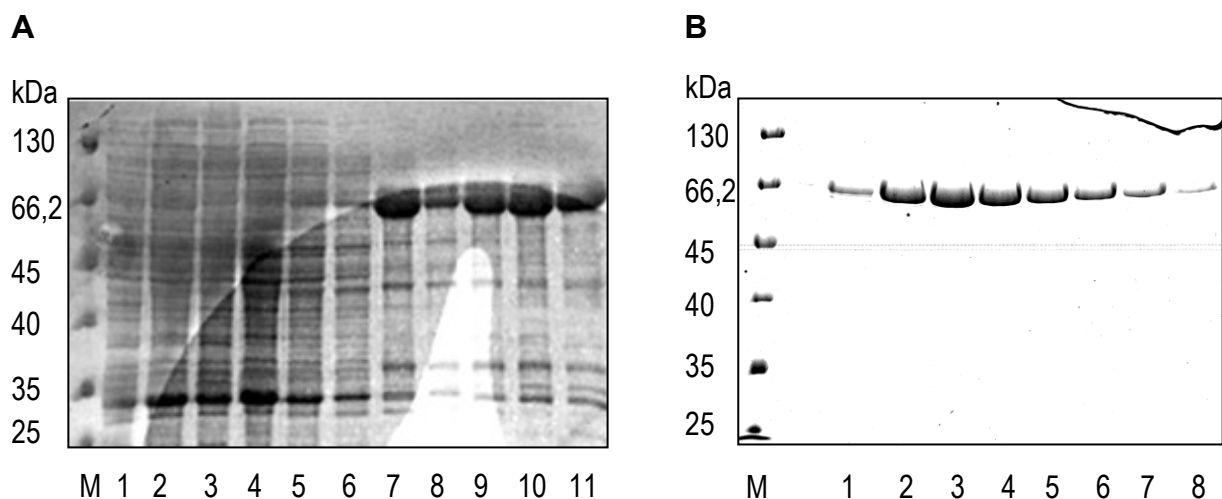
Um die Struktur von mGBP2 aufzuklären wurde in systematischen Experimenten das Protein in nukleotidfreier und  $GTP\gamma S$  gebundener Form kristallisiert. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Schmitt, mit der großzügigen Unterstützung durch Dr. Astrid Hoepfner. Nach Auflösung der Kristallstruktur von mGBP2 sollte ein Einblick in die biochemischen Mechanismen der Katalyse gewonnen werden können, welcher weitere Rückschlüsse auf eine mögliche biologische Funktion erlauben würde.



### 3.3 Biochemische Analysen von mGBP2

#### 3.3.1 Reinigung von mGBP2 Wildtyp und Mutanten

Die Reinigung von mGBP2 Wildtyp (WT) und Mutanten-Proteinen erfolgte durch Affinitätschromatographie über eine N-terminale Histidinmarkierung (His<sub>6x</sub>) an Nickel-NTA-Agarose und nachfolgender Größenausschluss-Chromatographie an Superdex 200 26/60 (Schwemmle and Staeheli, 1994). In Abbildung 3.4 A und B ist eine typische Reinigung am Beispiel von WT Protein auf Coomassie gefärbten Gelen dargestellt. Das heterolog exprimierte Protein im Rohlysat war nach der Ultrazentrifugation größtenteils im Überstand aber auch im Sediment enthalten. Der lösliche Anteil aus dem aufgetragenen Überstand band an die Nickel-NTA-Agarose und wurde durch einen Imidazolgradienten mit einer Reinheit von 80-90% eluiert. Verunreinigungen, sowie aggregiertes mGBP2 wurden auf einer Superdex 200 Säule größenausschlusschromatographisch abgetrennt und nur das monomere Protein gesammelt und aufkonzentriert. Nach der Reinigung war das Protein nukleotidfrei. Die Ausbeute lag für alle Proteine zwischen 0,1% und 0,5% bezogen auf das Bakterienfeuchtgewicht.



**Abb. 3.4: Reinigung von His<sub>6x</sub>-markiertem mGBP2 WT Protein.**

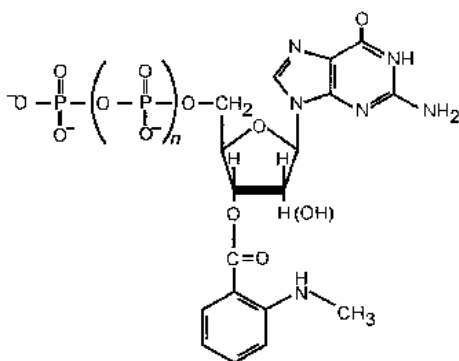
In jeder Spur wurden etwa 10 µg Protein aufgetragen. (A) M ist der SM0431 Größen-Marker (MBI Fermentas), 1 das Rohlysat, 2 der Überstand, 3 das Sediment, 4-6 der Durchlauf der Nickel-NTA-Agarose, 7-11 das mit dem Imidazolgradienten eluierte mGBP2. (B) Spuren 1-8 zeigen das Eluat nach der Größenausschluss-Chromatographie an einer Superdex 200.

### 3.3.2 Nukleotidbindung

Die GTP-Bindedomäne der GBPs ähnelt der Struktur der GTP-bindenden Proteine und besitzt vier konservierte Motive, die im Vergleich zur kanonischen Struktur der Ras-Proteine durch eine Zahl von Sekundärstrukturelementen modifiziert sind (Abb. 3.2 D, E; Prakash et al., 2000b; Vetter and Wittinghofer, 2001). Die GBPs besitzen die einzigartige Fähigkeit GMP, GDP und GTP zu binden. (Cheng et al., 1983; Dever et al., 1987; Cheng et al., 1991). Für große GTP-bindende Proteine sind jedoch im Vergleich zu den  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine und den Proteinen der Ras-Superfamilie schwache Nukleotidaffinitäten charakteristisch (John et al., 1990; Praefcke et al., 2004). Die Bestimmung von Affinität und Dynamik der Nukleotidbindung erlaubt Rückschlüsse auf den nukleotidgebundenen Zustand, in dem das Protein in der Zelle vorliegt und die Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit von weiteren Proteinen, welche die Nukleotid-Bindung bzw. -Freisetzung regulieren.

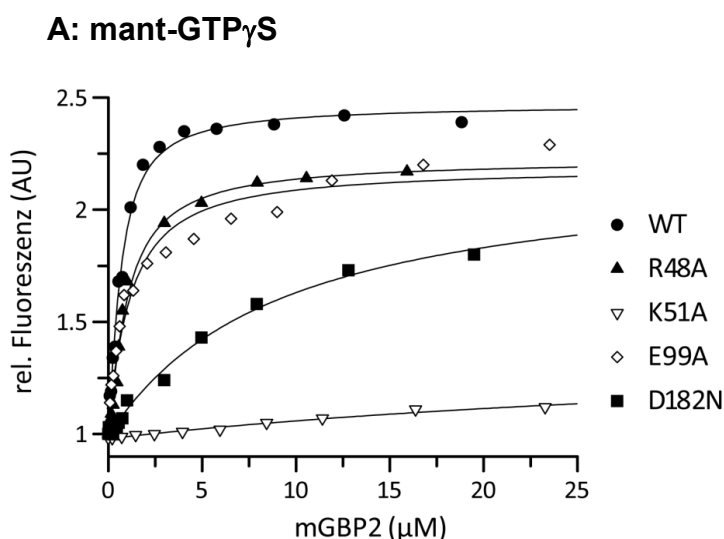
#### 3.3.2.1 Bindungsaffinitäten von WT mGBP2 und mGBP2-GTPase-Mutanten

Die Bindung von unmarkierten Nukleotiden an das Protein verursacht oft eine starke Hintergrundfluoreszenz (Praefcke et al., 1999). Aus diesem Grund wurden für die Bindungsexperimente mit einer spektroskopischen Sonde modifizierte Nukleotide verwendet. Für GTP-bindende Proteine haben sich 2'/3'-O-(N'-Methyl-anthraniloyl) (mant) markierte Nukleotid-Analoga bewährt (Abb. 3.5; Hiratsuka, 1983; Praefcke et al., 1999; Praefcke et al., 2004). Sie zeichnen sich durch eine hohe Quantenausbeute, große Stabilität, aber auch durch geringe Interferenz mit der Protein-Nukleotid-Interaktion und erhöhte Sensibilität gegenüber der chemischen Umgebung aus (Praefcke et al., 2004).



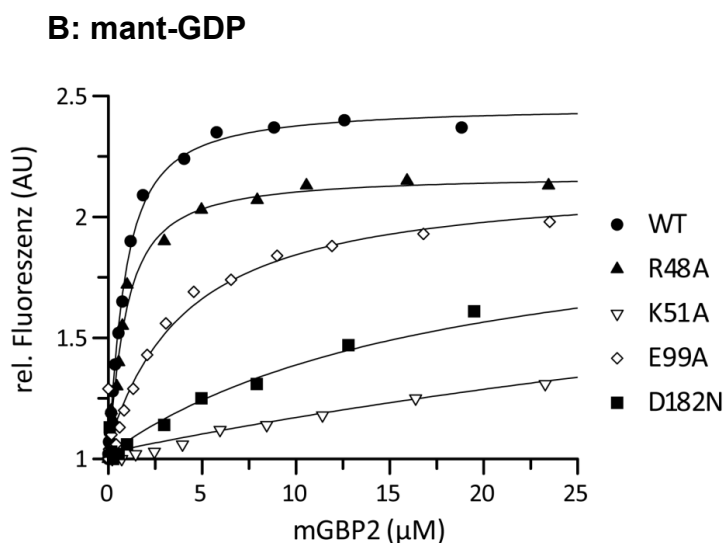
**Abb. 3.5: Strukturformel von mant-GTP (n = 2) und mant-GDP (n = 1) mit der mant-Gruppe kovalent gebunden an die 3'-Position der Ribose. Die 2'-Position kann in Desoxy-Form vorliegen, um eine Isomerisierung der mant-Gruppe in Position 2' und 3' zu vermeiden (Ahmadian et al., 2002). In den Messungen wurden Mischungen der 2'- und 3'-Isomere verwendet.**

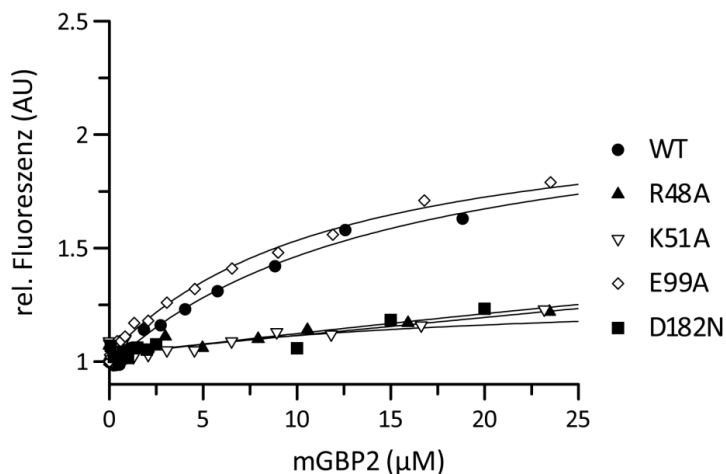
Die mant-gekoppelten Nukleotide werden bei 355 nm, fernab der Wellenlänge für die Proteinabsorption, angeregt und ihre Bindung an das Protein führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenz auf mehr als das Zweifache der Ausgangsfluoreszenz. Gleichzeitig verschiebt sich das Maximum der Emission von 442 nm zu größeren Wellenlängen (448 nm), was auf einen Wechsel des mant-Fluorophors in eine hydrophobe Umgebung hinweist (Dissertation G. Praefcke, 2001). Die relative Fluoreszenzerhöhung wurde in Gleichgewichtstitrationen von Protein als Signal für die Nukleotidbindung verwendet. Die Dissoziationskonstanten wurden durch die Anpassung von Kurven an die Datenpunkte bestimmt (s. 2.10.16). Die Abbildung 3.6 zeigt die Titration von mGBP2-WT und der GTPase-Mutanten mit mant-GMP, mant-GDP und dem GTP-Analogon mant-GTP $\gamma$ S im direkten Vergleich.



**Abb. 3.6: Fluoreszenztitration von mant-GTP $\gamma$ S (A), mant-GDP (B) und mant-GMP (C) an mGBP2.**

0,5  $\mu$ M mant-Nukleotid wurden im Puffer D (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT) bei 25 °C vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen mGBP2 bis zur Sättigung titriert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 355 nm, die Emissionsmessung bei 448 nm. Die Anpassung einer Wurzelfunktion an die Daten (s. 2.10.16) lieferte Dissoziationskonstanten, die in Tab. 3.1 gezeigt sind. AU: Arbitrary Units.



**C: mant-GMP**

In Tab. 3.1 sind die Daten aller Bindungsmessungen zusammengefasst.

**Tabelle 3.1: Fluoreszenztitration von mant-Nukleotiden nach der Bindung an mGBP2-WT und GTPase-Mutanten.**

Die mant-Fluoreszenz wurde gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und die Daten an eine quadratische Bindungskurve angepasst (s. 2.10.16).  $K_D$  ist die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation. Alle Messungen wurden im Puffer D mit  $0,5 \mu\text{M}$  mant-Nukleotid bei  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt.

	<b>mant-GTP<math>\gamma</math>S</b>	<b>mant-GDP</b>	<b>mant-GMP</b>
	$K_D(\mu\text{M})$	$K_D(\mu\text{M})$	$K_D(\mu\text{M})$
<b>WT</b>	$0,45 \pm 0,06$	$0,54 \pm 0,04$	$14,4 \pm 2,84$
<b>R48A</b>	$0,74 \pm 0,12$	$0,63 \pm 0,09$	$19,8 \pm 9,57$
<b>K51A</b>	$44,1 \pm 18,2$	$58,9 \pm 5,83$	$107 \pm 31,8$
<b>E99A</b>	$0,97 \pm 0,20$	$3,87 \pm 1,08$	$13,4 \pm 1,74$
<b>D182N</b>	$8,77 \pm 1,52$	$18,0 \pm 7,48$	$> 100$

Für das mGBP2-WT Protein lagen die Dissoziationskonstanten für die mant-Nukleotide im mikromolaren Bereich. Die Stärke der Bindung nahm von mant-GTP $\gamma$ S ( $0,45 \mu\text{M}$ ) über mant-GDP ( $0,54 \mu\text{M}$ ) zu mant-GMP ( $14,4 \mu\text{M}$ ) ab, wobei die Affinitäten zu mant-GTP $\gamma$ S und mant-GDP fast identisch waren. Zusätzlich wurden die Affinitäten zu einem anderen GTP-Analogen, mant-GppNHp bestimmt, um den Einfluss der Phosphatgruppenmodifikation auf das Bindungsverhalten auszuschließen (s. Anhang Abb. A, Tab. A). Interaktion des WT Proteins und aller anderen Mutanten mit allen drei Nukleotiden wiesen einen Hillkoeffizienten unter 1,2 auf (Richter et al., 1995; Herrmann

and Nassar, 1996). Dies bedeutet, dass eine 1:1 Stöchiometrie der Bindung von Nukleotid und Monomer vorliegt und dass nur jeweils eine Bindestelle existiert.

Die Mutation des Arginins an der Position 48 im G1 Motiv zeigte nur geringe Auswirkungen auf die Bindung aller drei mant-Nukleotide verglichen mit dem WT Protein. Auffällig ist der verminderte Gesamtfluoreszenzanstieg bei gesättigten Proteinkonzentrationen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei dieser Mutante die Abschirmung zum Lösungsmittel von Teilen des Nukleotids in der Umgebung des mant-Fluorophors weniger effektiv ist (Prakash et al., 2000a; Prakash et al., 2000b; Dissertation G. Praefcke, 2001; Praefcke and McMahon, 2004; Ghosh et al., 2006).

Deutlich stärker betroffen ist die zweite Mutante in der P-Schleife von mGBP2, K51A. Die Affinitäten für alle drei mant-Nukleotide waren deutlich vermindert, besonders jedoch für mant-GTP $\gamma$ S und mant-GDP. Die Dissoziationskonstante von mant-GTP $\gamma$ S betrug mit 44,1  $\mu$ M das 97-fache des WT Proteins. Mit 58,9  $\mu$ M war die Interaktion mit mant-GDP ähnlich schwach. Die Bindung von mant-GMP war auf ein Siebtel zurückgegangen, sie war die schwächste von allen drei Nukleotiden. Diese Beobachtungen entsprechen den Erwartungen, die aufgrund der vorhergesagten Wechselwirkungen der  $\epsilon$ -Aminogruppe von K51 von mGBP2 mit den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten und aus Mutationen der homologen Aminosäure in anderen GTP-bindenden Proteinen gestellt wurden (Vetter and Wittinghofer, 2001; Ahmadian et al., 2003; Praefcke et al., 2004; Abdullah et al., 2009). Die Mutation K51A könnte eine Unterbrechung dieser und anderer möglicher Wechselwirkungen, zum Beispiel mit der Switch II Region, und demzufolge die Inhibition der Nukleotidbindung verursachen (Vetter and Wittinghofer, 2001).

Die Effekte der Mutation im Switch II Motiv sind deutlich kleiner als für die Lysin-Mutante in der P-Schleife. Die Mutante E99A band mant-GDP 7-fach schwächer (3,87  $\mu$ M) und zeigte eine zweifach geringere Affinität zu mant-GTP $\gamma$ S (0,97  $\mu$ M) als der WT. Die Interaktion mit mant-GMP war nicht signifikant verändert (13,4  $\mu$ M). Die Switch II Region wird in Folge der katalytischen Reaktion Konformationsänderungen ausgesetzt (Knudsen et al., 2001). Die Glutaminsäure an der Position 99 könnte daher direkt an der Stabilisierung des Übergangszustandes (Vetter and Wittinghofer, 2001) partizipieren, wie es für das Glutamin 61 in Ras Proteinen beschrieben ist (Buhrman et al., 2010).

Die Mutation D182N im G4 Motiv verursachte eine 33-fache Erhöhung der Dissoziationskonstante (18,0  $\mu\text{M}$ ) für mant-GDP und eine 19-fache für mant-GTP $\gamma$ S (8,77  $\mu\text{M}$ ), eine Bindung zu mant-GMP war allerdings kaum nachweisbar. Die höchste Affinität bestand jedoch, ähnlich wie bei der K51A Mutante, zu mant-GTP $\gamma$ S. Die Asparaginsäure ist in allen GTP-bindenden Proteinen konserviert. Der Austausch dieser Aminosäure zu Asparagin führt in hGBP1 zu einer Veränderung der Bindungsspezifität von Guanin- zu Xanthinnukleotiden (Praefcke et al., 1999). Dabei wird vorhergesagt, dass zuerst die Base an das Protein bindet und erst nach einer Konformationsänderung das Protein Wechselwirkungen mit Phosphatgruppen eingeht (Praefcke et al., 1999).

Aus der Messung der Dissoziationskonstanten der Nukleotide in Proteintitrationsexperimenten folgt, dass unter zellulären Bedingungen von etwa 50-100  $\mu\text{M}$  GTP, 150 mM Salz und 37°C (Otero, 1990; Praefcke et al., 1999) das WT Protein, sowie die Mutanten R48A und E99A überwiegend, und die D182N Mutante zu einem geringeren Maße, im GTP-gebundenen Zustand vorliegen. Die Mutante K51A liegt hier zum großen Teil nukleotidfrei vor. Die Größenordnung der Dissoziationsgeschwindigkeiten erlaubt für den WT und alle Mutanten einen schnellen und selbstständigen Nukleotidaustausch in Lösung. Im Gegensatz dazu benötigen die GTPasen der Ras-Superfamilie, aufgrund ihrer deutlich höheren Bindungsaffinitäten Austauschfaktoren (GEFs), um in den GTP-gebundenen Zustand überführt zu werden.

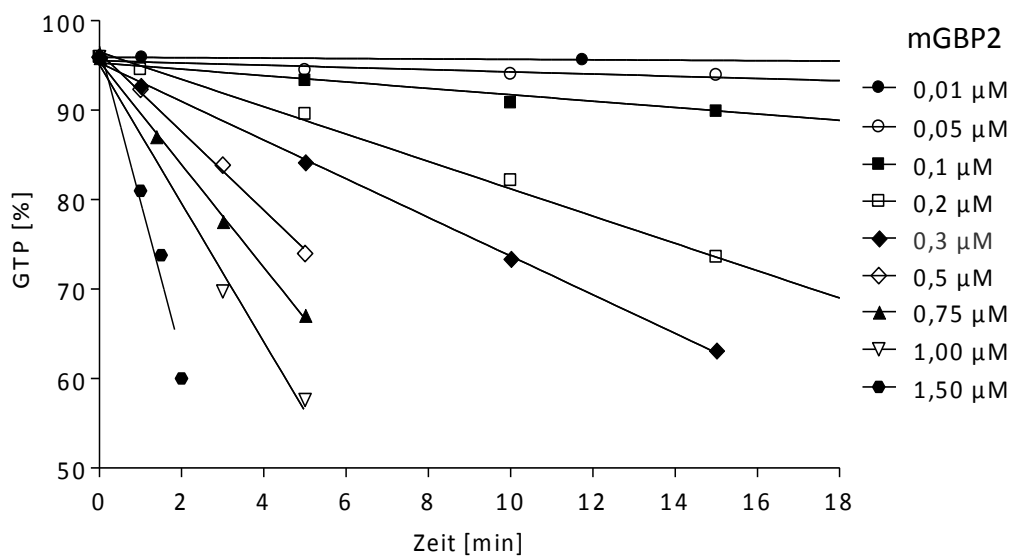
### **3.3.3 Kooperative Hydrolyse von GTP über GDP zu GMP**

#### **3.3.3.1 GTP-Hydrolyse von WT mGBP2**

Sowohl die Identifizierung des Nukleotid-gebundenen Zustandes als auch die hydrolytische Umsetzung von GTP sind entscheidende Faktoren für die funktionale Regulation von GTPasen. Die katalytischen Eigenschaften von GBPs unterscheiden sich stark von Ras-ähnlichen oder heterotrimeren GTP-Bindeproteinen durch ihre hohen Umsatzraten. Die humanen GBPs besitzen die einzigartige Fähigkeit GTP nicht nur zu GDP, aber auch zu GMP zu hydrolysieren (Schwemmle and Staeheli, 1994; Neun et al., 1996; Praefcke et al., 1999).

Die Reaktionskinetik von mGBP2 wurde daher an einer reversed-phase HPLC-Apparatur verfolgt, die die Bestimmung der Anteile der beiden Produkte GDP und GMP in

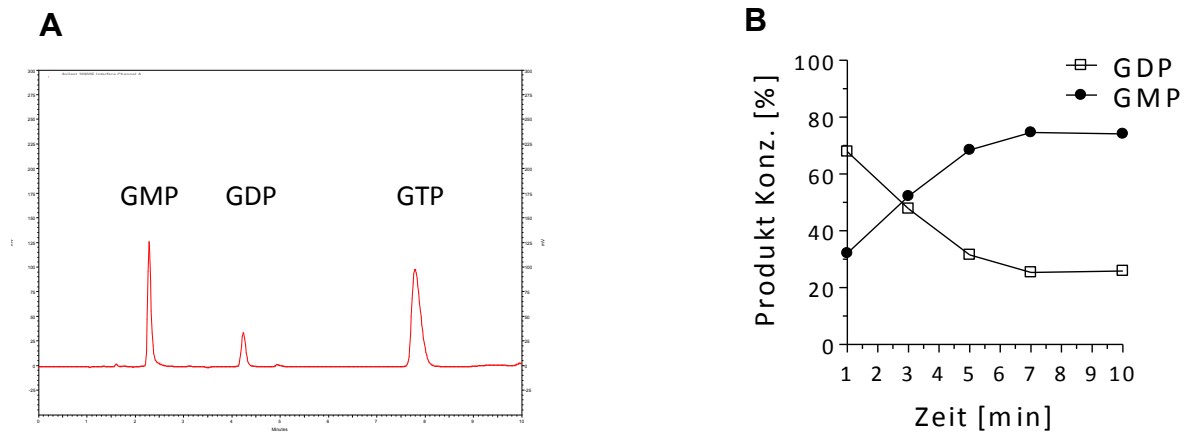
Abhängigkeit von der Proteinkonzentration unter Bedingungen der Substratsättigung (pseudo-erste Ordnung) ermöglichte. Interessant ist, dass für die Stabilität des Proteins die Anwesenheit von DTT als Reduktionsmittel unbedingt erforderlich war, denn ohne DTT konnte keine hydrolytische Aktivität gemessen werden. In Abbildung 3.7 sind die Reaktionsverläufe für das WT Protein dargestellt. Ein bereits bei Zeitpunkt 0 messbarer GDP Anteil von ca. 4% ist auf die nur bedingte Reinheit des Ausgangssubstrats zurückzuführen. Dieser wurde bei den weiteren Berechnungen berücksichtigt. Für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wurden bei jeder Proteinkonzentration jeweils nur die Daten aus dem linearen Bereich der GTP-Abnahme (bis 60%) an eine Regressionsgerade angepasst, damit Effekte wie Produktinhibition oder Enzyminaktivierung, die bei längerer Inkubation auftreten (Schwemmle and Staeheli, 1994; Praefcke et al., 2004), die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten nicht verfälschten.



**Abb. 3.7: Kinetik der Hydrolyse von GTP durch mGBP2.**

Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von 1 mM GTP durch steigende Konzentrationen von mGBP2 im Puffer D (s. 2.3.2) bei 37°C. Aus der Steigung der Regressionsgeraden und der Protein Konzentration ergibt sich die spezifische Aktivität (s. 2.10.17).

Zunächst wurde GDP gebildet, um im wahrscheinlich sukzessiven Verlauf der Reaktion zu GMP hydrolysiert zu werden, hier exemplarisch für die 0,5 μM WT Protein Konzentration dargestellt (Abb. 3.8 A, B). Die Hydrolyse von GTP durch das WT Protein bei 37°C ergab GMP mit einem Anteil von 74% als Hauptprodukt der Reaktion (Tab. 3.2, Abb. 3.8 A, B).

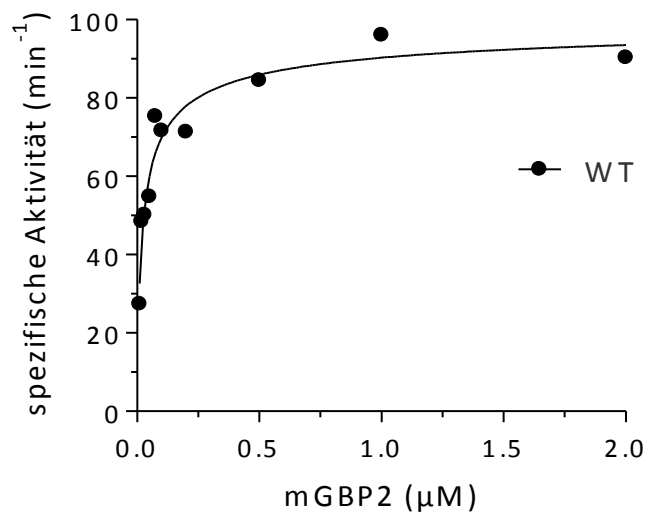


**Abb. 3.8: Produktverhältnis der Hydrolyse von GTP durch mGBP2.**

Verlauf der GTP-Hydrolyse von 1 mM GTP durch 0,5  $\mu$ M mGBP2 im Puffer D (s. 2.3.2) bei 37°C, 2 min Wert (A). Produktverhältnis der GTP-Hydrolyse von 1 mM GTP durch 0,5  $\mu$ M mGBP2 (B).

Im Zuge der GTP-Hydrolyse aggregieren GTP-gebundene Dimere oder Tetramere von Dynamamin in ringähnlichen Strukturen, welche die intermolekulare GTPase-Aktivität stimulieren (Herskovits et al., 1993b). Für mGBP2 konnte ebenfalls ein Anstieg der spezifischen Aktivität mit steigender Proteinkonzentration nachgewiesen werden, wenn die spezifischen Aktivitäten gegen die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen wurden (Abb. 3.9). Diese Aktivierung weist auf eine intermolekulare kooperative Wechselwirkung der mGBP2 Moleküle während der katalytischen Reaktion hin. Die minimale annehmbare kooperative Einheit der Proteine ist ein Dimer. Der berechnete Hill-Koeffizient von 0,95 als Maß der Kooperativität besagt, dass jedes der Monomere katalytisch aktiv sein muss. Die Anpassung einer Wurzelfunktion, die eine Dimerisierung beschreibt (s. 2.10.17), lieferte für das WT Protein eine maximale spezifische Aktivität von 102  $\text{min}^{-1}$  und eine Dissoziationskonstante für das Dimer von 0,03  $\mu$ M (Tab. 3.2). Auffällig ist, dass die Affinität des mGBP2-Dimers 10-fach höher war als die des humanen Orthologs hGBP1 (Praefcke et al., 2004).

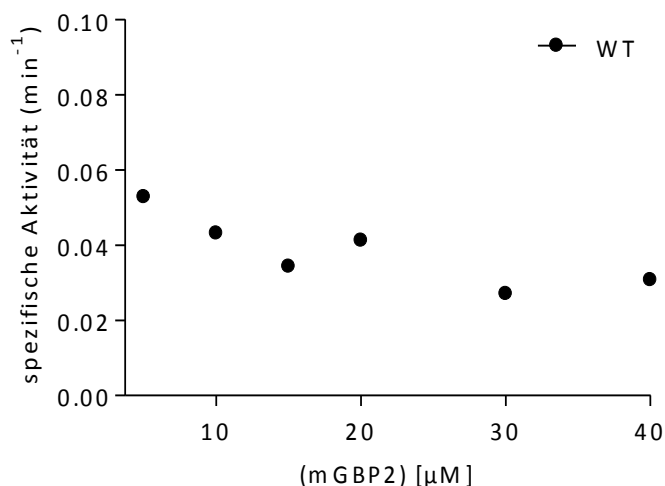




**Abb. 3.9: Konzentrationsabhängigkeit der Hydrolyse von GTP durch WT mGBP2.**

Auftragung der spezifischen Aktivität der Hydrolyse von 1 mM GTP als Funktion der Konzentration an mGBP2. Die Anpassung einer Wurzelfunktion (s. 2.10.17), die eine Dimerisierung beschreibt, liefert eine Dissoziationskonstante von 0,03  $\mu\text{M}$  und eine maximale spezifische Aktivität von 102  $\text{min}^{-1}$ .

Im Gegensatz zu GTP, konnte GDP aus der Lösung von mGBP2 nicht als Substrat verwendet werden (Abb. 3.10), obwohl es mit einer beinahe identischen Affinität wie GTP-Analoga gebunden wurde (Tab. 3.1). Das impliziert entweder eine für die Ausbildung eines katalytisch funktionalen Dimers zu große Dimerisierungskonstante oder, dass die Aktivierung ausschließlich nach GTP-Bindung erfolgt, was für eine sequenzielle Abspaltung des  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphats vom GTP spricht.



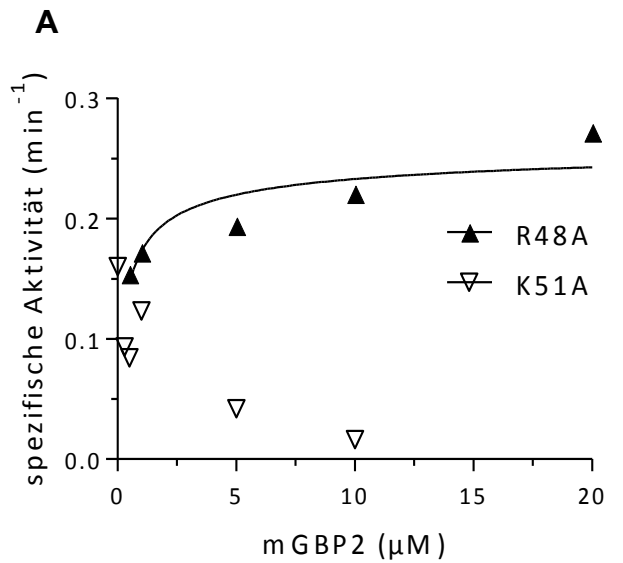
**Abb. 3.10: Externes GDP ist kein Substrat für mGBP2.**

Auftragung der spezifischen Aktivität der Hydrolyse von 1 mM GDP als Funktion der Konzentration an mGBP2. Die Anpassung einer Wurzelfunktion (s. 2.10.17), die eine Dimerisierung beschreibt, ergibt keine Kooperativität der Reaktion.

### 3.3.3.2 GTP-Hydrolyse der mGBP2-GTPase-Mutanten

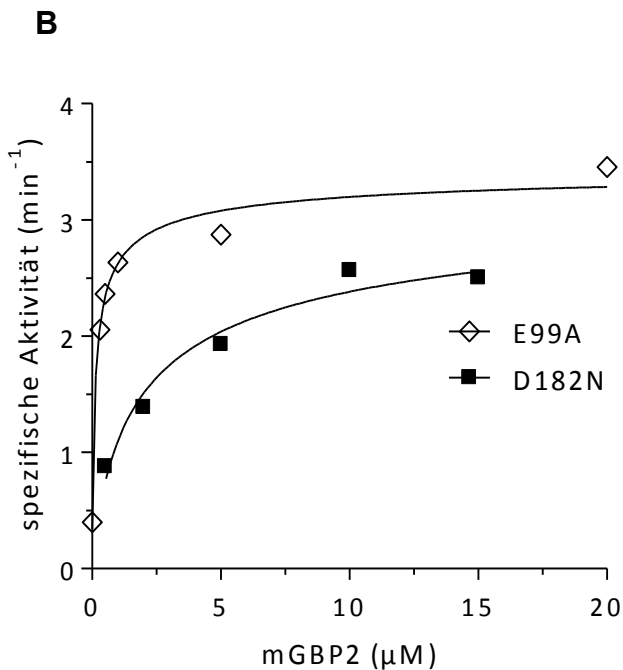
Der Einfluss der Mutationen in der GTP-Bindedomäne auf die GTP-Hydrolyse wurde im Folgenden untersucht. Die Messungen zur Kooperativität der GTP-Hydrolyse wurden wie beim WT durchgeführt. Abbildung 3.11 zeigt die spezifischen Aktivitäten der G-Domäne-

Mutanten. Die Werte für die maximale spezifische Aktivität sowie die Dissoziationskonstanten der Dimerisierung und das Produktverhältnis sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.



**Abb. 3.11: Konzentrationsabhängigkeit der GTP-Hydrolyse durch mGBP2-Mutanten.**

Auftragung der spezifischen Aktivität der Hydrolyse von 1 mM GTP im Puffer D (s. 2.3.2) bei 37 °C als Funktion der Konzentration an mGBP2-GTPase-Mutanten in der P-Schleife (R48A und K51A) (A), in der Switch II Region (E99A) und im G4 Motiv (D182N) (B).



**Tabelle 3.2: Konzentrationsabhängigkeit der GTP-Hydrolyse durch mGBP2-WT und GTPase-Mutanten.**

$V_{\max}$  ist die maximale spezifische Aktivität der Hydrolyse von 1 mM GTP als Funktion der Konzentration von mGBP2. Die Anpassung der Daten an eine Wurzelfunktion (s. 2.10.17) beschreibt eine Dimerisierung des Proteins.  $K_D$  ist die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation des Protein-Dimers. Der Anteil von GMP am Produktverhältnis ist in der letzten Spalte rechts aufgetragen. Alle Messungen wurden im Puffer D (s. 2.3.2) bei 37°C durchgeführt.

	$V_{\max}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Dimer $K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	GMP (%)
<b>WT</b>	101,80 $\pm$ 4,24	0,03 $\pm$ 0,01	74
<b>R48A</b>	0,26 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,19	35
<b>K51A</b>	< 0,09	nicht kooperativ	0
<b>E99A</b>	3,50 $\pm$ 0,13	0,18 $\pm$ 0,04	7
<b>D182N</b>	3,50 $\pm$ 0,33	3,01 $\pm$ 1,10	26

Beide Mutanten der P-Schleife (R48A und K51A, Tab. 3.2, Abb. 3.11A) wiesen die geringste spezifische Aktivität auf. Die R48A Mutante hat eine 390-fach geringere spezifische Aktivität ( $0,26 \text{ min}^{-1}$ ) als der WT und produziert weniger als die Hälfte an GMP (35%). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Mutation den zweiten Katalyse-Schritt verlangsamt. Die Dimerisierungskonstante ist 11-fach erhöht ( $0,34 \mu\text{M}$ ). Das bedeutet, dass die Mutation eine deutliche Abnahme der Proteinaffinität oder eine erniedrigte Dimerstabilität verursacht. Basierend auf der Struktur für das hGBP1 mit GppNHp, bei welcher die Seitenkette des entsprechenden Arginins ins Lösungsmittel ragt (PDB Eintrag 1F5N, Prakash et al., 2000b), könnte diese Aminosäure in mGBP2 an der Oligomerisierung beteiligt sein.

Für die K51A Mutante konnte eine auf unter 0,1% des WT herabgesetzte maximale spezifische Aktivität und damit keine Abhängigkeit der Hydrolyseaktivität von der Proteinkonzentration nachgewiesen werden (Abb. 3.11 A). Aus diesem Grund konnte die Dimerbildungskonstante nicht bestimmt werden. Die Produktion von GMP war für die Mutante ebenfalls nicht detektierbar. Dies lässt den Schluss zu, dass das Lysin 51 direkt in die GTP-Bindung- und Hydrolyse involviert ist, indem es mit seiner positiv geladenen Seitenkette die negativen Ladungen des  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphats kompensiert, und dass die K51A Mutation zur Dysfunktion des mGBP2 Proteins führt.

Die maximale spezifische Aktivität der Switch II Mutante E99A betrug 3,4% des WT ( $3,5 \text{ min}^{-1}$ , Tab. 3.2, Abb. 3.11B) und die Hydrolyse ergab nur 7% GMP. Die Dimeraffinität machte dabei ein Sechstel der Dimerisierungskonstanten des WT Proteins ( $0,18 \mu\text{M}$ ) aus.

Die Switch II Region könnte demnach für den zweiten Hydrolyseschritt wichtig sein, in dem GMP aus intermediär gebildetem GDP entsteht, dabei ist E99 unmittelbar an der Katalyse beteiligt. Die Mutation inhibiert wahrscheinlich die, im Verlauf der Hydrolyse induzierbaren, Konformationsänderungen des Proteins, wie es für hGBP1 beschrieben wird (Praefcke et al., 2004; Modiano et al., 2005).

Die D182N Mutante aus dem G4 GTP-Bindungsmotiv unterscheidet sich von allen anderen Mutanten durch eine über 100-fach erniedrigte Dimer Affinität (3,01  $\mu\text{M}$ ) und 26% GMP Produktion (Tab. 3.2). Das spiegelt sich in der stark erniedrigten Stimulation der GTPase-Aktivität und in der Umsatzgeschwindigkeit von nur 3,5  $\text{min}^{-1}$  wieder (Abb. 3.11B).

### **3.3.4 Nukleotidabhängige Oligomerisierung von WT mGBP2 und mGBP2-GTPase-Mutanten**

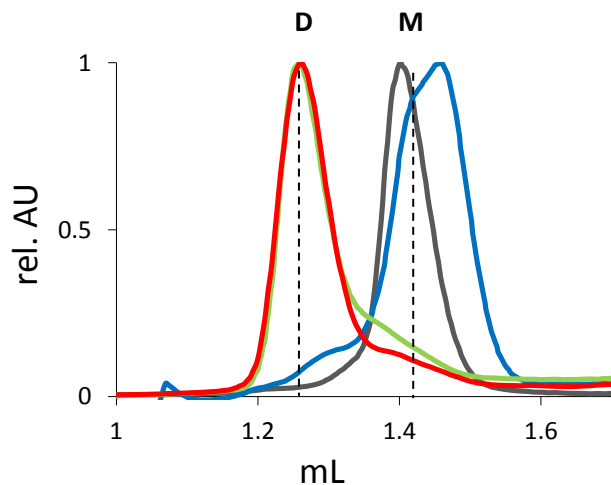
#### **3.3.4.1 Bindung von GTP $\gamma$ S, GDP und GMP**

Der Anstieg der spezifischen Aktivität der Hydrolyse mit zunehmender Protein Konzentration lässt auf eine kooperative intermolekulare Wechselwirkung zwischen den mGBP2-Molekülen in Analogie zu hGBP1, hGBP2, Dynamin und Mx schließen (Neun et al., 1996; Praefcke et al., 2004; Chappie et al., 2010; Haller et al., 2010). Der Zusammenhang zwischen dieser Wechselwirkung und dem gebundenen Nukleotid liefert Informationen, die zur Aufklärung des Mechanismus der Hydrolyse von GTP zu GMP beitragen.

Die nukleotidabhängige Wechselwirkung von mGBP2 und den Mutanten wurde durch analytische Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex 200 HR 10/30 SEC Säule (GE Healthcare, USA) an einem ÄKTAmicro FPLC System (GE Healthcare, USA) untersucht. Die Kalibrierung der Säule erfolgte durch Auftragen von Proteinen bekannter Größe. Vor jedem Lauf wurde die Säule mit dem Gelfiltrationspuffer (s. 2.3.2, Puffer D) mit oder ohne Nukleotid äquilibriert und das Protein im entsprechenden Puffer 15 min auf Eis vorinkubiert. Im Puffer waren die Nukleotide in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  für GTP $\gamma$ S und GDP und 50  $\mu\text{M}$  für GMP enthalten. Die Konzentrationen wurden mit Rücksicht auf die, bei den Bindungstitrationen bestimmten Nukleotid-Dissoziationskonstanten des WT Proteins gewählt und entsprechen mindestens dem 3,5-

fachen der erhaltenen Werte. Diese Vorgehensweise diente der besseren Vergleichbarkeit des Oligomerisierungsverhaltens von WT und Mutantenproteinen.

Die Elutionsprofile der Läufe in Abbildung 3.12 zeigen, dass das mGBP2-WT Protein in nukleotidfreiem und GMP-gebundenem Zustand als Monomer vorlag. Bei Bindung von GTP $\gamma$ S oder GDP eluierte das Protein als Dimer.

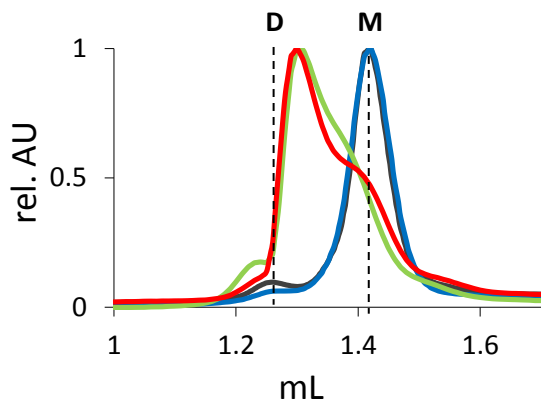
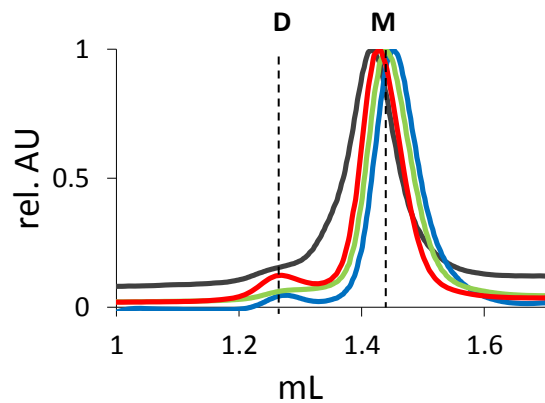
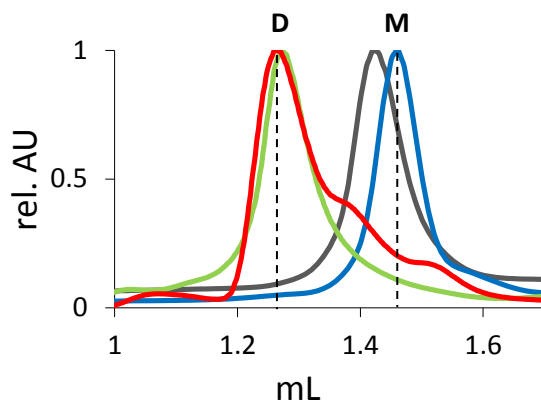
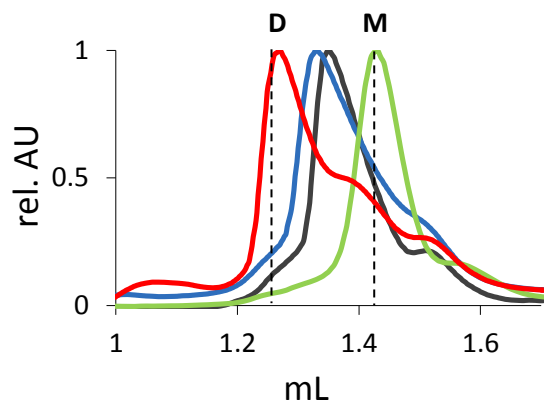


**Abb. 3.12: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2.**

30  $\mu$ M mGBP2 wurden ohne Nukleotid (-), bzw. mit je 5  $\mu$ M GTP $\gamma$ S (-), GDP (-) oder 50  $\mu$ M GMP (-) im Puffer D (s. 2.3.2) 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf einer analytischen Größenausschluss-Chromatographiesäule getrennt, die mit dem identischen Puffer und Nukleotidkonzentration äquilibriert war. Ohne Nukleotid, sowie in Gegenwart von GMP eluierte mGBP2 als Monomer, in Gegenwart von GTP $\gamma$ S oder GDP als Dimer. **D**: Dimer; **M**: Monomer.

Die Dimerisierung des Proteins wurde zusätzlich mittels Multiwinkel-Lichtstreuungstechnologie (SEC-MALS, Wyatt Technologies, Dr. Britta Tschapek) bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Die Oligomerisierung der GTPase-Mutanten wurde analog zum WT mittels Größenausschluss-Chromatographie in Gegenwart verschiedener Nukleotide bestimmt. In Gegenwart von GMP und ohne Nukleotid lagen alle Proteine als Monomere vor (Abb. 3.13). Die Mutante R48A bildete in Gegenwart von GTP $\gamma$ S und GDP Mischpopulationen aus Mono- und Dimeren (Abb. 3.13 A), obwohl die Nukleotid-Affinitäten dieser Mutante mit dem WT fast identisch waren. Folglich steht die kooperative GTP-Hydrolyse mit der Dimerisierung im Zusammenhang.

**A: R48A****B: K51A****C: E99A****D: D182N****Abb. 3.13: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2-GTPase-Mutanten.**

30  $\mu\text{M}$  mGBP2 wurden ohne Nukleotid (-), bzw. mit je 5  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (-), GDP (-) oder 50  $\mu\text{M}$  GMP (-) im Puffer D (s. 2.3.2) 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf einer analytischen Größenausschluss-Chromatographiesäule aufgetrennt. (A) Die Punktmutante R48A ist nur in Gegenwart von  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  oder GDP ein Gemisch aus Dimer und Monomer, sonst ein Monomer. (B) Die Punktmutante K51A ist unter allen Bedingungen ein Monomer. (C) Die Punktmutante E99A ist mit  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  und GDP ein Dimer, sonst ein Monomer. (D) Die Punktmutante D182N ist mit  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  ein Dimer, sonst ein Monomer. **D**: Dimer; **M**: Monomer.

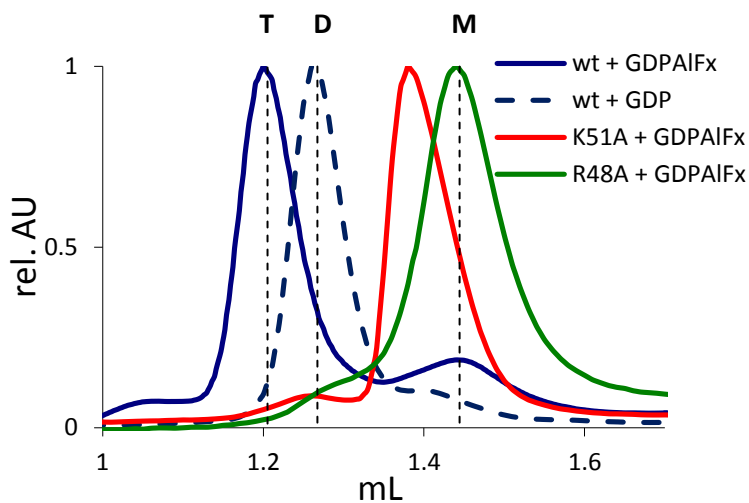
Die Mutante K51A lag in Gegenwart aller Nukleotide als Monomer vor (Abb. 3.13 B). Um zu überprüfen, ob die K51A Mutante durch die erhöhte Nukleotidkonzentration zu einer Assoziation gebracht werden kann, wurde die Mutante, mit zehnfach höheren Konzentrationen an  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  oder GDP inkubiert, das mutierte Protein blieb jedoch auch unter modifizierten Bedingungen ein Monomer (s. Anhang Abb. B).

Die Bindung von GTP $\gamma$ S und GDP an die E99A Mutante führte zur Dimerisierung des Proteins vergleichbar zum WT (Abb. 3.13 C). An dieser Mutante lässt sich festmachen, dass die Nukleotidbindung die Dimerisierung von mGBP2 induziert.

Die D182N Mutante lag als Dimer in Gegenwart von GTP $\gamma$ S und als Monomer bei GDP vor (Abb. 3.13 D), wobei bei höheren GDP Konzentrationen eine deutliche Tendenz zum Dimer detektierbar war (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten entspricht den Erwartungen im Hinblick auf die berechneten Bindungsaffinitäten für diese Nukleotide. Interessant sind die Elutionsprofile dieser Mutante mit GMP und ohne Nukleotid. Die Struktur von hGBP1 zeigt, dass die korrespondierende Aminosäure (D184) im nukleotidfreien Zustand zum Lösungsmittel gekehrt ist und bietet damit die erste Kontaktoberfläche für das Nukleotid (Prakash et al., 2000b). Die Mutation könnte den hydrodynamischen Radius des Proteins beeinflussen und somit eine Veränderung des Elutionsverhaltens verursachen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Asparaginsäure 182 von mGBP2 die Nukleotidbindungseigenschaften und konsequenterweise die oligomerisierungsabhängige Stimulation der Aktivität des Proteins beeinflusst.

#### **3.3.4.2 Bindung von GDP Aluminiumfluorid**

Für Ras, G $\alpha$  und andere nukleotidbindende Proteine ist gezeigt worden, dass der GDP Aluminiumfluorid (GDP $\cdot$ AlF $_x$ ) Komplex einen Imitator der Phosphatgruppe im Übergangszustand der GTP-Hydrolyse darstellt (Coleman et al., 1994; Gasper et al., 2008). Dabei nimmt das AlF $_x$  eine planare Konformation an, wie sie für das sonst tetraedrische  $\gamma$ -Phosphat von GTP im Übergangszustand postuliert wird (Praefcke et al., 1999). Bei Proteinen aus der Ras-Superfamilie wird der Übergangszustand nur im Komplex mit GAPs gebildet, wobei das GAP über den katalytisch aktiven „Arginin-Finger“ eine positive Ladung in die Nähe der Phosphatgruppen des Nukleotids im aktiven Zentrum bringt, welche den Übergangszustand stabilisiert. Zur Prüfung des Oligomerisierungsmodells hat sich der Nachweis der Bindung von AlF $_x$  als besonders leichtes und aussagekräftiges Experiment herausgestellt (Wittinghofer, 1997; Gasper et al., 2008). Das hGBP1 bildet Tetramere in Anwesenheit des GDP $\cdot$ AlF $_x$  (AlF $_3$  oder AlF $_4^-$ ) Komplexes (Praefcke et al., 2004). GDP $\cdot$ AlF $_x$  wurde unter Beimischen von 300  $\mu$ M Aluminiumchlorid und 10 mM Natriumfluorid zu 50  $\mu$ M GDP hergestellt und die Mischung mit dem Protein inkubiert (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von WT und GTPase-Mutanten von mGBP2.**

30  $\mu\text{M}$  WT, R48A oder K51A mGBP2 wurden mit 50  $\mu\text{M}$  GDP $\cdot$ AlF $_x$  und der WT zusätzlich mit 50  $\mu\text{M}$  GDP im Puffer D (s. 2.3.2) 15 min auf Eis inkubiert und anschließend mittels Gelfiltration getrennt. Die analytische Säule wurde im Vorfeld mit dem identischen Puffer mit Nukleotid äquilibriert. Das WT Protein eluierte als Tetramer, R48A und K51A als Monomer. Das WT Protein eluierte als Dimer in Gegenwart von GDP. **T**: Tetramer; **D**: Dimer; **M**: Monomer.

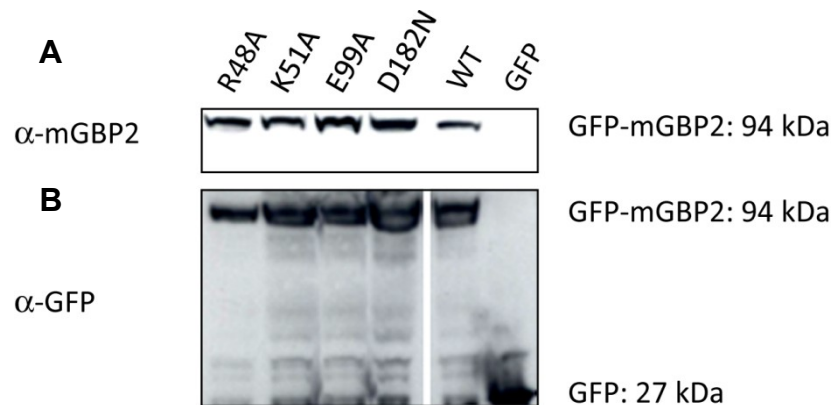
Die Moleküle des WT Proteins assemblierten im Komplex mit GDP $\cdot$ AlF $_x$  zu Tetrameren. Die R48A Mutante war nicht in der Lage den Übergangszustand im Komplex mit GDP und Aluminiumfluorid zu stabilisieren und blieb monomer. Ähnlich verhielt sich die K51A Mutante, bei welcher die Anwesenheit von GDP $\cdot$ AlF $_x$  keinen Einfluss auf die Oligomerisierung nahm. Es ist auch unwahrscheinlich, dass die Mutante AlF $_x$  überhaupt binden kann, da das Lysin in ähnlichen Komplexen von Ras und Rho eine ionische Wechselwirkung mit dem AlF $_x$  eingeht (Ahmadian et al., 1997).

### 3.4 Subzelluläre Lokalisation von WT mGBP2 und GTPase-Mutanten

Der Einfluss der eingeführten Mutationen in der GTPase-Domäne auf die biologische Funktion von mGBP2 sollte in folgenden Experimenten auf zellulärer Ebene untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde in vorangegangenen Experimenten eine mGBP2 $^{-/-}$  Mauslinie etabliert (Degrandi et al., 2012, eingereicht). Anschließend wurden Plasmid-Konstrukte von WT und GTPase-Mutanten von mGBP2 mit N-terminal fusioniertem eGFP-Protein (im Folgenden als GFP bezeichnet) hergestellt und mit Hilfe des lentiviralen Gentransfers in mGBP2 $^{-/-}$  murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) transduziert. Stabil exprimierende Zellen wurden mit der Zellsortier-Technologie angereichert und die Expression der Fusionsproteine nach 16 h IFN- $\gamma$  Stimulation im Western Blot analysiert (Abb. 3.15). Zum Nachweis der Proteine wurde das mGBP2-



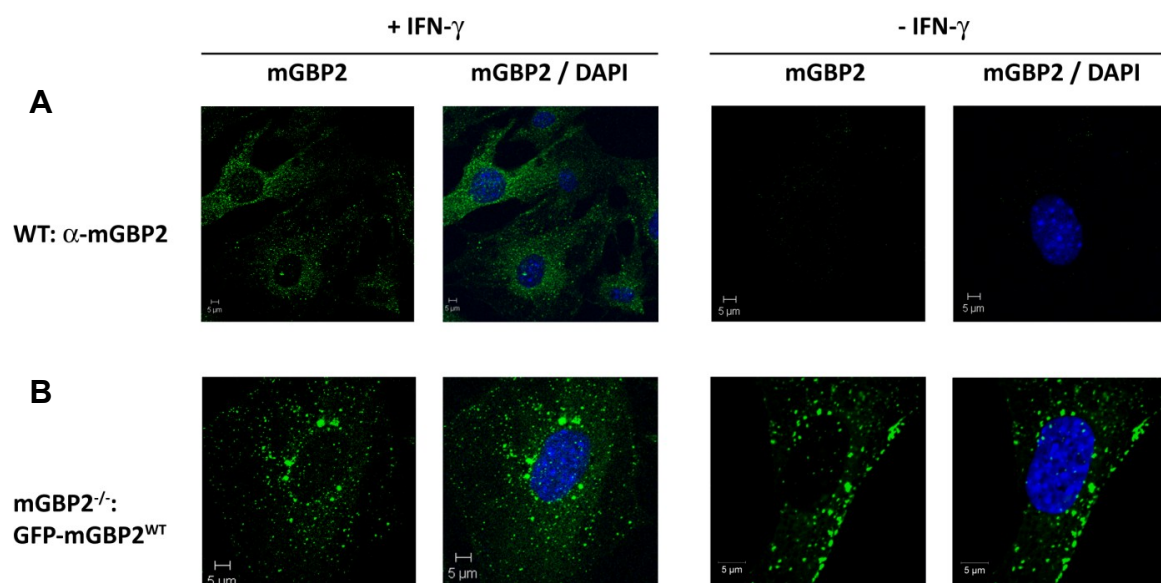
spezifische Antiserum (Degrandi et al., 2012, eingereicht) oder der monoklonale GFP-Antikörper (Roche) eingesetzt. Die Expression von GFP allein diente als Kontrolle.



**Abb. 3.15: Expression der mGBP2-WT und GTPase-Mutanten nach stabiler Transduktion von mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs.**

Die Zellen wurde für 16 h mit 100 U/mL IFN- $\gamma$  stimuliert, anschließend lysiert und der postnukleäre Überstand im Western Blot mit  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum (**A**) oder  $\alpha$ -GFP Antikörper (**B**) analysiert. Dargestellt ist die Expression von GFP-mGBP2-WT, -R48A, -K51A, -E99A, -D182N und GFP als Kontrolle. Es wurden jeweils 20  $\mu$ g Protein aufgetragen.

Vestal et al. zeigten bereits 2000 in BMDM (bone marrow derived macrophages) und NIH 3T3 Fibroblasten, dass das mGBP2 Protein subzellulär in vesikelartigen Strukturen von heterogener Form und Größe angeordnet ist (Vestal et al., 2000). Die genaue Identität dieser Strukturen bleibt jedoch bislang ungeklärt. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz sollte die Lokalisation des endogenen mGBP2 Genprodukts mit dem spezifischen Antiserum in primären WT MEFs, sowie des rekonstituierten GFP-WT-Proteins in transduzierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) untersucht werden (Abb. 3.16).



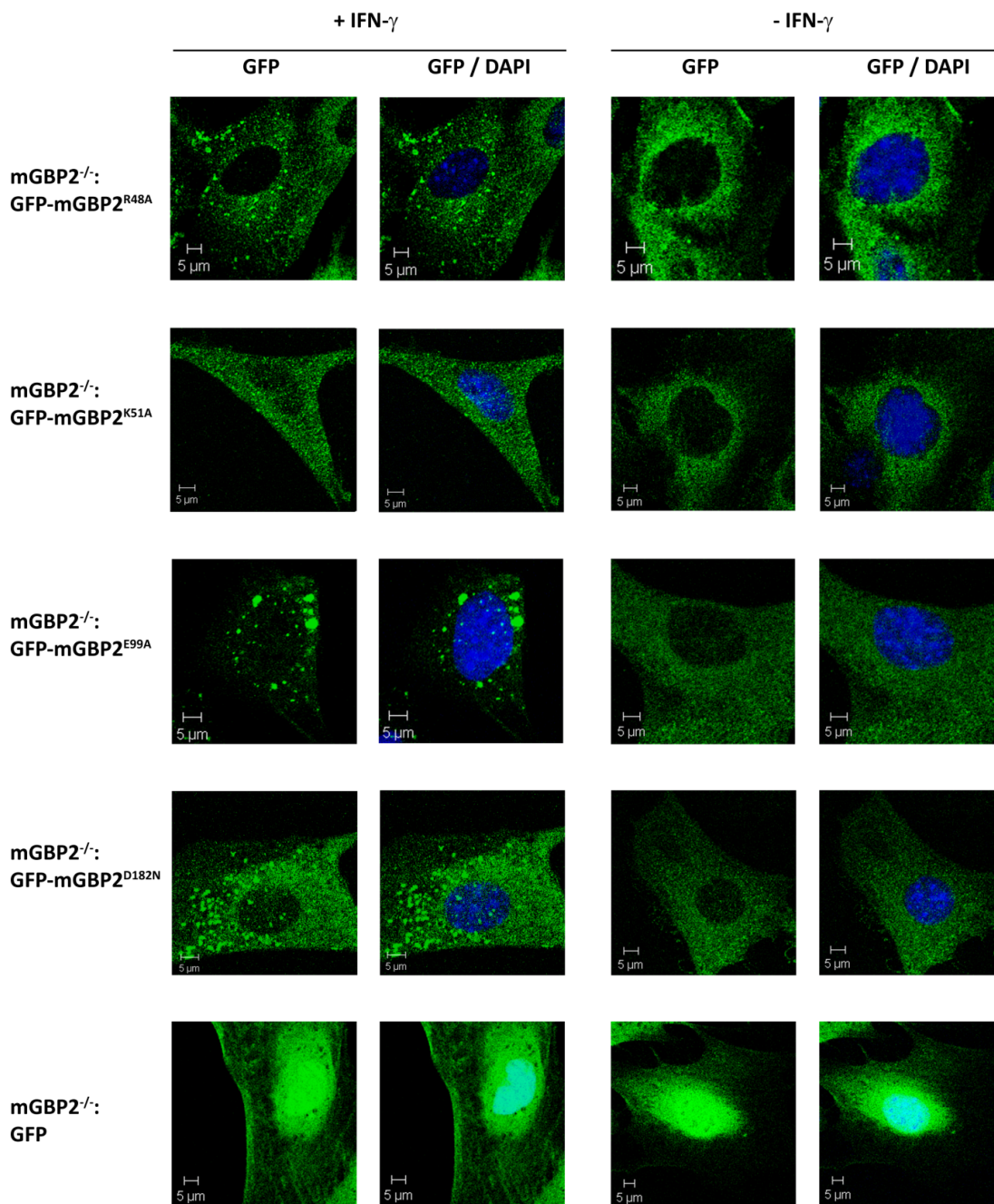
**Abb. 3.16: Subzelluläre Lokalisation von endogenem mGBP2 Protein in primären MEFs und von GFP-mGBP2-WT in transduzierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs.**

Die Zellen wurden 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen und anschließend mit dem peptidspezifischen, Affinitäts-gereinigten  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum aus dem Kaninchen (Degrandi et al., 2007) gefärbt (**A**) oder die GFP-Fluoreszenz des Fusionskonstrukts (**B**) detektiert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop LSM510 angefertigt. Grün: mGBP2; blau: DAPI zur Zellkernfärbung.

Wie in Abb. 3.16 dargestellt, befand sich der größte Anteil sowohl des endogenen als auch des rekonstituierten Proteins nach 16 h Stimulation mit IFN- $\gamma$  in vesikelartigen Kompartimenten im Zytoplasma der Zellen, außerhalb des Zellkerns. Lediglich die Größe und die Fluoreszenzintensität der vesikelartigen Strukturen des Fusionsproteins unterschieden sich geringfügig von endogenen Strukturen. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass das GFP-Fusionsprotein eine andere Verteilung als das endogene Protein hat, es ist jedoch möglich, dass der Sekundärantikörper (Cy2-konjugiertes Ziegen-IgG gegen Kaninchen), der für die Detektion des, aus dem Kaninchen gewonnenen,  $\alpha$ -mGBP2-Antiserums verwendet wurde, eine etwas niedrigere Fluoreszenzintensität im Vergleich zum GFP-Protein aufweist. Da wir die identischen Geräteeinstellungen des LSM Konfokalmikroskops verwendet haben, könnte dies der Grund sein, warum die endogenen zytosolischen Vesikel weniger intensiv scheinen. Die N-terminale Fusion der GTPase mit dem GFP-Fluoreszenzprotein wurde daher für weitere Experimente mit mGBP2-Mutanten-Proteinen eingesetzt.

mGBP2 trägt in seiner Primärsequenz ein CaaX-Erkennungsmotiv für die Geranylgeranyltransferase I, welche das Protein posttranslational isoprenyliert. In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass diese Modifizierung mGBP2 ermöglicht, mit Lipidmembranen zu interagieren (Vestal et al., 1998; Vestal et al., 2000). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei den vesikelartigen Strukturen, in denen mGBP2 lokalisiert, um membranumgebene Kompartimente handelt. Besonders interessant ist die vesikuläre Verteilung von GFP-mGBP2-WT in unstimulierten Zellen. Das deutet darauf hin, dass für die Lokalisation von mGBP2 in Vesikeln die Gegenwart von IFN- $\gamma$  induzierbaren Faktoren nicht benötigt wird. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen für die subzelluläre Verteilung von überexprimiertem mGBP2 in JAK1<sup>-/-</sup> MEFs, in denen IFN- $\gamma$  auf die Lokalisation von mGBP2 in Vesikeln keinen Einfluss nahm (Vestal et al., 2000). Dennoch konnte nach optischer Auswertung vieler Konfokalaufnahmen eine erhöhte Konzentrierung von mGBP2 in vesikelartigen Strukturen nach IFN- $\gamma$  Stimulation der Zellen verzeichnet werden (s. Anhang Abb. F).

Die Verteilung der mGBP2-Mutanten innerhalb der MEFs wurde auf die gleiche Weise ermittelt. Die Abbildung 3.17 zeigt die Konfokalaufnahmen von IFN- $\gamma$  stimulierten oder unbehandelten Zellen, die stabil die Genprodukte der GTPase-Mutanten exprimieren. Besonders auffällig ist, dass im Gegensatz zum WT, sämtliche GTPase-Mutanten in unstimulierten Zellen eine Fehllokalisierung aufwiesen. Dies bedeutet, dass die Assemblierung in vesikelartigen Strukturen ein proteinintrinsischer, von der GTPase-Funktion abhängiger Prozess ist und keiner weiteren IFN- $\gamma$  induzierbaren Faktoren bedarf. Nach der IFN- $\gamma$  Stimulation lokalisierten einige Mutanten anders als das WT Protein. Die beiden Mutanten mit Defekten in der GTP-Hydrolyse, die R48A und die E99A Mutanten, die sich jedoch durch normale Bindungsaffinitäten zu Guaninnukleotiden auszeichneten, waren in Strukturen ähnlich zu denen des GFP-mGBP2-WT Konstrukts angeordnet. Die Bindungsmutante D182N wurde als eine Mischpopulation aus sowohl vesikulärem als auch homogen verteiltem Protein im Zytoplasma der MEFs vorgefunden. Die dysfunktionale K51A Mutante wies eine ausschließlich homogene zytosolische Distribution auf. Daraus lässt sich folgern, dass vor allem die Guanylatbindung und die darauf folgende Protein-Selbstassemblierung in Multimere für die vesikuläre Verteilung von mGBP2 in der Zelle entscheidend sind. Erwähnenswert ist außerdem, dass sowohl das WT Protein als auch alle G-Domäne-Mutanten, im Gegensatz zur GFP Kontrolle, außerhalb des Zellkerns lokalisierten. Dies wurde in Immunfluoreszenzexperimenten mit Ko-Färbungen von mGBP2 und zellkernständigem PARP-1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1) zusätzlich verifiziert (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.17: Subzelluläre Lokalisation von mGBP2-GTPase-Mutanten in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs.**

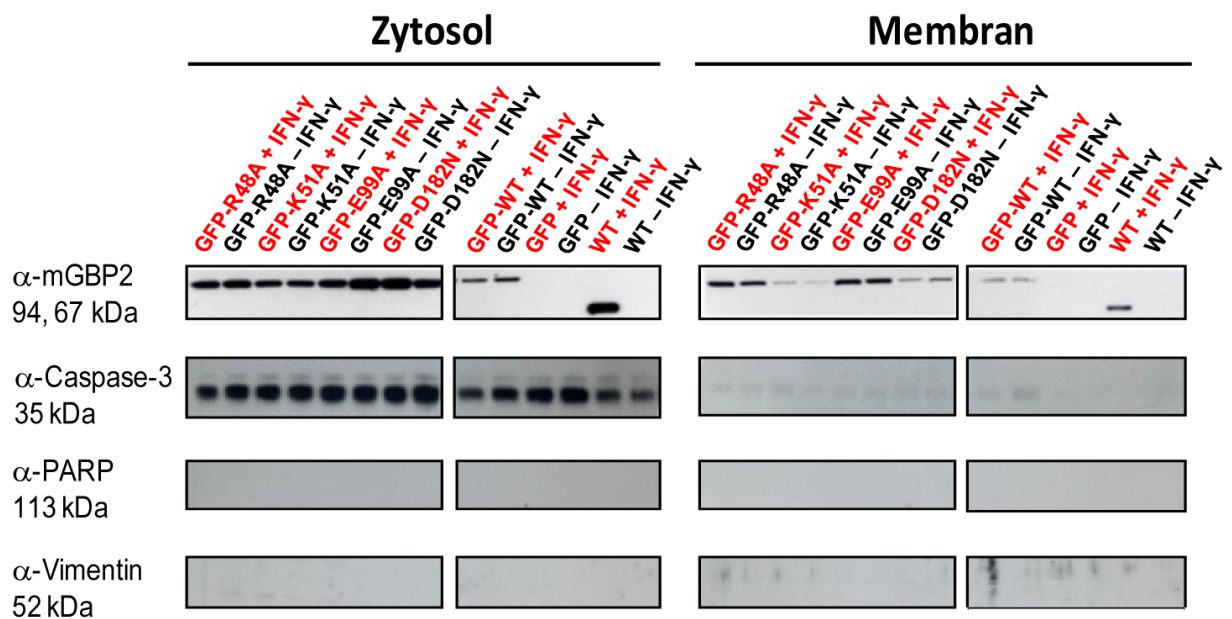
Die Zellen wurden 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen, anschließend wurde die GFP Fluoreszenz detektiert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop LSM510 angefertigt. Grün: mGBP2; blau: DAPI zur Zellkernfärbung.

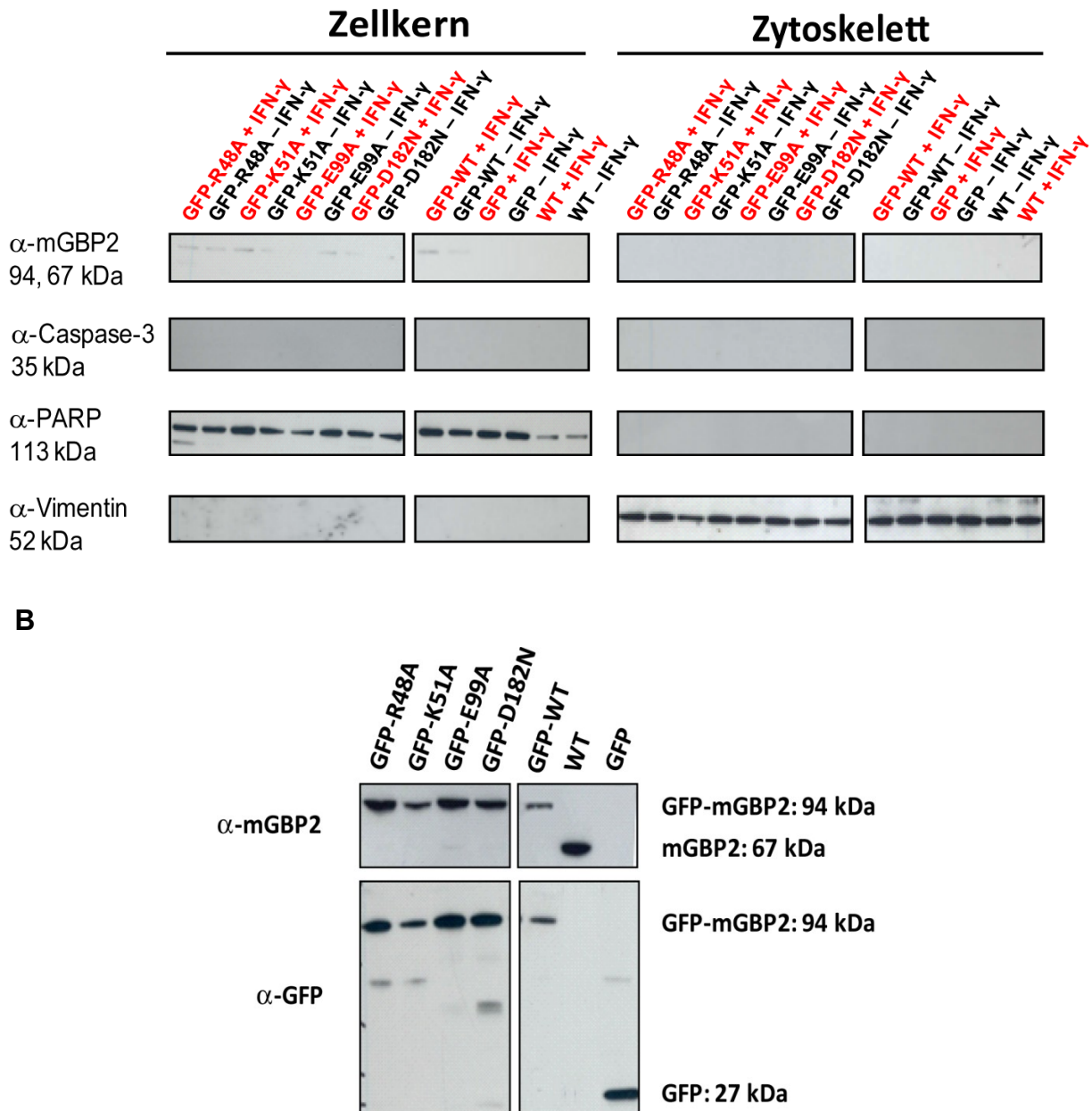
### 3.4.1 Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe des ProteoExtract<sup>®</sup> Subcellular Proteome Extraction Kits

Um herauszufinden, ob es sich bei den granulären Strukturen von mGBP2 tatsächlich um membranumgebene Kompartimente und nicht nur um Proteinaggregate handelt und ob

die Mutationen in der G-Domäne die vesikuläre Anordnung beeinflussen, wurde die subzelluläre Lokalisation von WT und GTPase-Mutanten in Abhängigkeit von IFN- $\gamma$  mit Hilfe des ProteoExtract<sup>®</sup> Subcellular Proteome Extraction Kits (Calbiochem-Merck, s 2.10.2) untersucht. Hierfür wurden WT MEFs oder mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen, welche die GFP-Fusionskonstrukte für das WT Protein und die GTPase-Mutanten von mGBP2 sowie GFP alleine stabil exprimierten, für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden je Kultur 1 x 10<sup>6</sup> Zellen geerntet und fraktioniert. Die Zellysate wurden dabei in vier Fraktionen aufgetrennt: Zytosol, Membran, Zellkern und Zytoskelett. Die Abbildung 3.18 zeigt repräsentative Western-Blots von drei Fraktionierungen mit den dazugehörigen Lysatkontrollen. Zur Prüfung der Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden Markerproteine angefärbt, die spezifisch in diesen Fraktionen zu erwarten waren: Caspase-3 für das Zytosol, PARP-1 für den Zellkern und Vimentin für die Intermediärfilamente als Teil des Zytoskeletts.

A





**Abb. 3.18: Fraktionierung von WT und GFP-Fusionsproteinen aus stabil exprimierenden mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs mit dem ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem-Merck).**

WT und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, die stabil das GFP-mGBP2-WT Protein und die GFP-mGBP2-GTPase-Mutanten sowie GFP als Kontrolle exprimierten, wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert (rote Schrift) oder unstimuliert gelassen und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers geerntet und aufgetrennt. Die Fraktionierung von  $1 \times 10^6$  Zellen ergab vier Fraktionen: Zytosol, Membran, Zellkern und Zytoskelett. Diese wurden auf SDS-Gelen separiert und auf Membranen übertragen. mGBP2 wurde mit dem  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum detektiert. Als Fraktionskontrollen dienten  $\alpha$ -Caspase-3 für das Zytosol,  $\alpha$ -PARP-1 für den Zellkern und  $\alpha$ -Vimentin für das Zytoskelett (A). Zur Expressionskontrolle wurden nach IFN- $\gamma$  Stimulation zusätzlich Zelllysate von allen Zellkulturen hergestellt und mit dem  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum oder einem  $\alpha$ -GFP Antikörper gefärbt (B). Es wurden jeweils 20  $\mu$ L Protein aufgetragen.

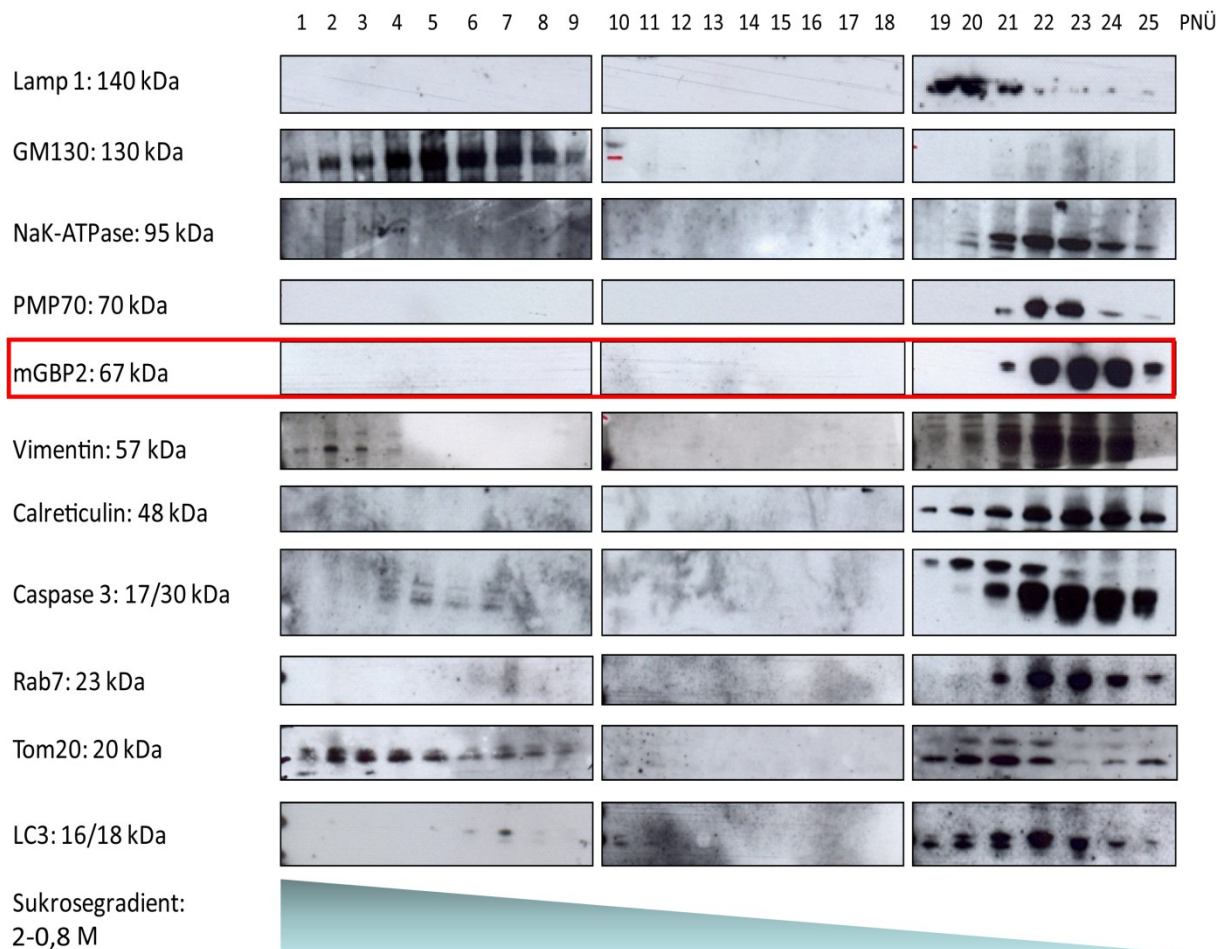
Die Lysatkontrollen (Abb. 3.18 B) zeigen, dass sowohl das endogene Protein als auch die rekonstituierten GFP-Fusionskonstrukte in den Zellen unterschiedlich stark, jedoch nachweisbar exprimiert wurden. Die bei der GFP-Färbung des Expressionsblots zusätzlich

detektierten Banden weisen auf eine geringfügige Kreuzreaktivität des  $\alpha$ -GFP Antikörpers (Roche) hin und sind nicht spezifisch (Abb. 3.18 B). Die Reinheit der Fraktionen ließ sich anhand der Färbungen der Markerproteine nachweisen (Abb. 3.18 A), somit gelang mit dem Kit eine saubere Trennung der Fraktionen. Alle rekonstituierten GTPasen lagen größtenteils zytosolisch mit und ohne die IFN- $\gamma$  Stimulation vor. Das endogene Protein wurde erst nach IFN- $\gamma$  Stimulation exprimiert. Eine Aussage über eine quantitative IFN- $\gamma$  Abhängigkeit der Lokalisation der Proteine in den Fraktionen ist nicht möglich. Auffällig ist, dass der Anteil des membranständigen Proteins in Relation zum Zytosol deutlich geringer ist. Dennoch konnte für alle GTPasen, sowohl für die rekonstituierten Konstrukte als auch für das endogene Protein eine Assoziation mit Membranen detektiert werden. Die relativ geringeren Mengen der K51A-Mutante und des WT Proteins in dieser Fraktion korrelierten mit den jeweils geringeren Expressionsniveaus der betreffenden Proteine (Abb. 3.18 A, B). Es fanden sich zu einem geringen Anteil alle GFP-Konstrukte in der Zellkernfraktion und kaum nachweisbar in der Zytoskelett-Fraktion (bei stärkerer Belichtung, Daten nicht gezeigt), jedoch nicht das endogene Protein. Zusammenfassend gibt diese Fraktionierung einen Hinweis auf eine mögliche Assoziation von mGBP2 mit Membranen.

### **3.4.2 Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe des Zuckergradienten**

Um die Natur der mGBP2-Vesikel zu identifizieren wurden primäre MEFs mit IFN- $\gamma$  stimuliert, anschließend mechanisch in einem isotonischen, detergentfreien Puffer lysiert, um die Unversehrtheit der Zellorganellen zu gewährleisten, und der postnukleäre Proteinüberstand (PNÜ) an einem Zuckergradienten mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt (Modiano et al., 2005). Die so erhaltenen Fraktionen wurden in Immunfärbungen nach einer ko-Lokalisation von mGBP2 mit Markerproteinen für intrazelluläre Organellen untersucht (Abb. 3.19).





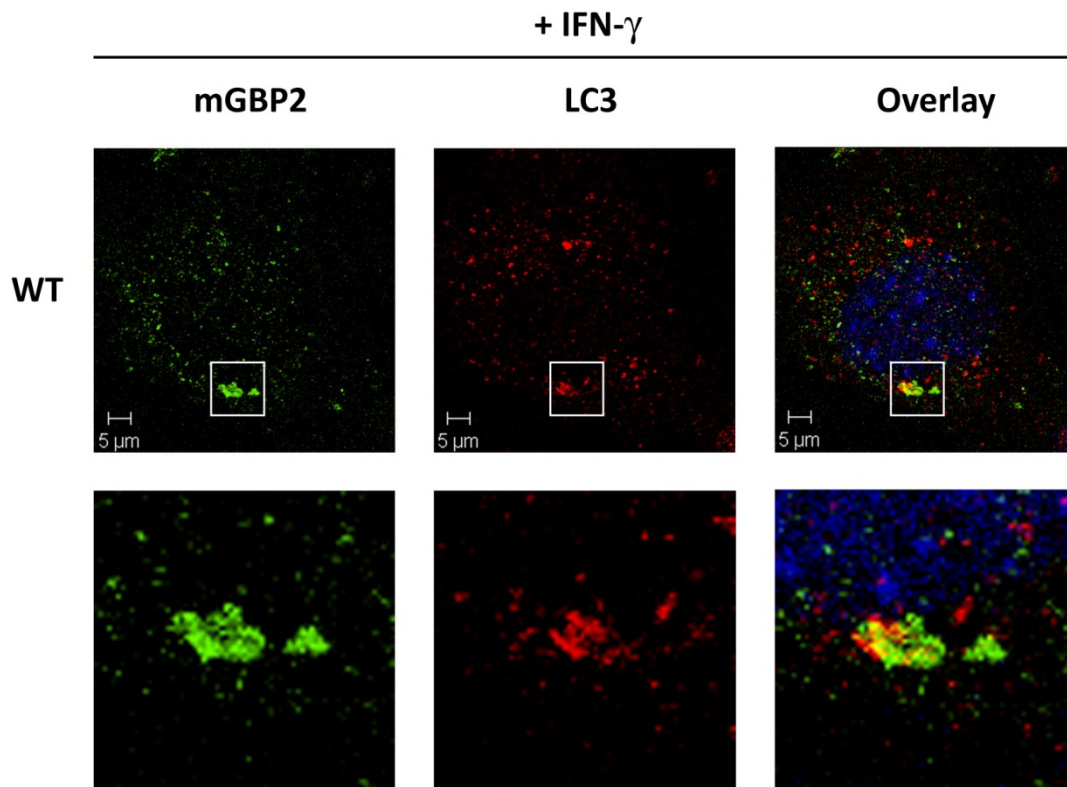
**Abb. 3.19: mGBP2 Verteilung korreliert mit intrazellulären Membranstrukturen in der Zellfraktionierung mit Hilfe eines Zuckergradienten.**

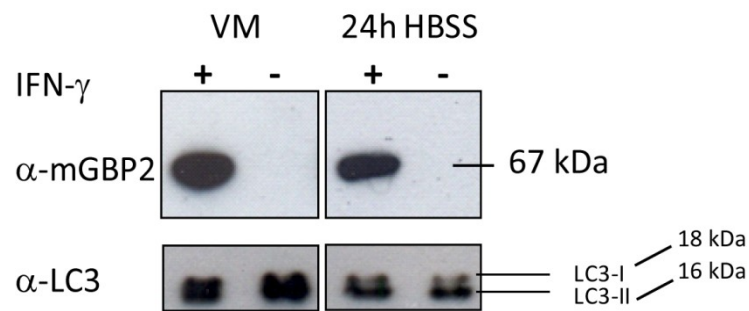
Für 16 h mit IFN- $\gamma$  behandelte primäre WT MEFs wurden im isotonischen Puffer mit 0,8 M Sukrose mechanisch in einem Zell-Homogenisator lysiert und der postnukleäre Überstand (PNÜ) auf einen 0,8-2M kontinuierlichen Sukrosegradienten aufgeschichtet. Nach der Ultrazentrifugation bei 261.000  $\times g$  für 16 h bei 4°C wurden 0,5-mL Fraktionen von hohen zu niedrigen Dichten des Gradienten abgenommen (1-25). 30  $\mu$ L der jeweiligen Proben wurden auf 4-12% SDS-PAGE Gele geladen, im Western-Blot auf eine mit BSA geblockte PMSF-Membran transferiert und in Immunofärbungen nach Lokalisation von mGBP2 gegen Lysosom (Lamp 1), Golgi-Apparat Matrix Protein (GM130), Plasmamembran (NaK-ATPase), Peroxisom (PMP70), Intermediärfilament (Vimentin), ER (Calreticulin), Zytosol (Caspase-3), spätes Endosom (Rab7), Mitochondrien (Tom20) und Autophagosom (LC3) untersucht. Späte Fraktionen (19-25) mit der geringsten Dichte enthalten Membranen.

Die Abbildung 3.19 zeigt eines von drei Experimenten. mGBP2 eluierte in Fraktionen mit der geringsten Dichte (21-25), die Membranen enthalten. In denselben Fraktionen konnten Markerproteine für Plasmamembran (NaK-ATPase), Peroxisomen (PMP70) (Gartner and Valle, 1993), späten Endosomen (Rab7) (Bottger et al., 1996), ER (Calreticulin), Zytoskelett (Vimentin), Autophagosomen (LC3 I/II), deren Bildung durch IFN- $\gamma$  induziert wurde, und Zytosol (Caspase-3), jedoch nicht für Mitochondrien (Tom20) oder den Golgi-Apparat (GM130), detektiert werden (Beckers et al., 1987; Harley et al., 2001). Dieses Ergebnis gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass mGBP2 in der Zelle



membranassoziiert vorliegt. Für hGBP1 konnte eine Assoziation mit dem Golgi-Komplex nach Aktivierung der Zellen mit GDP·AlF<sub>x</sub> nachgewiesen werden (Modiano et al., 2005; Fres et al., 2010). Die Inkubation von WT, mit IFN- $\gamma$  stimulierten MEFs mit GDP·AlF<sub>x</sub> veränderte jedoch die intrazelluläre Lokalisation von mGBP2 nicht (s. Anhang Abb. D). In früheren Studien konnte mit indirekter Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie die Ko-Lokalisation von mGBP2 mit Endosomen, Lysosomen, ER oder Plasmamembran (Vestal et al., 2000; Dissertation C. Konermann, 2008 und diese Arbeit) nicht nachgewiesen werden. Allerdings liefern die Konfokalaufnahmen von lebenden Zellen, wo sich die GFP-mGBP2-Vesikel auch an der Plasmamembran beobachten ließen (s. Anhang, Abb. E, Abb. F), ein Indiz für die Assoziation von mGBP2 mit Lipiden plasmamembranösen Ursprungs. Die vesikelartigen Strukturen von mGBP2 entsprechen jedoch nicht den Peroxisomen, trotz der in der Primärsequenz enthaltenen Peroxisomen-Zielsequenz (Gould et al., 1988, Daten nicht gezeigt). Eine direkte Ko-Lokalisation mit dem Autophagosom-Marker LC3 konnte nur mit Strukturen beobachtet werden, die in der Literatur als „riesige“ oder „aborted“ Autophagosomen bezeichnet werden (Traver et al., 2011, Abb. 3.20).

**A**

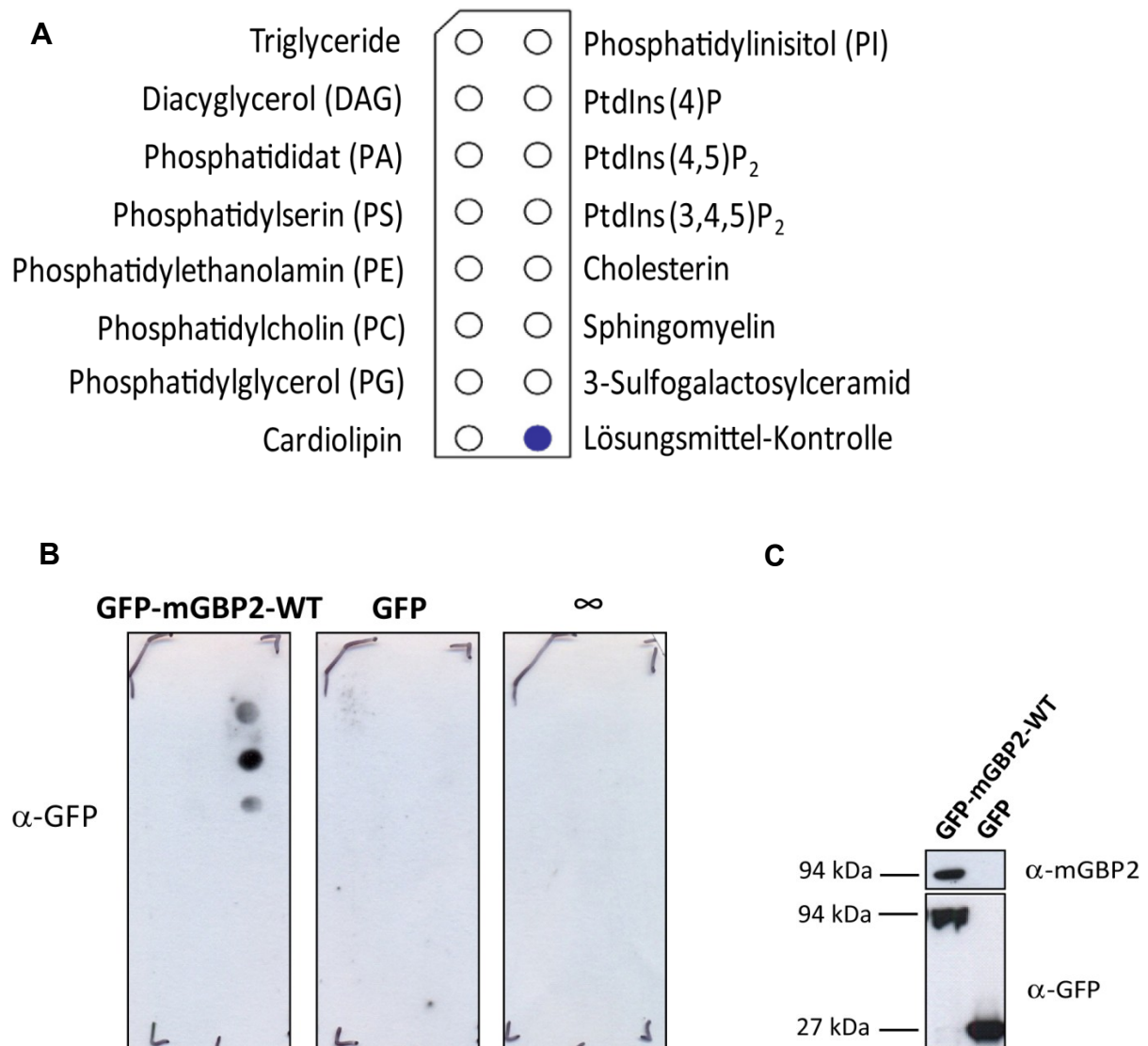
**B**

**Abb. 3.20: Ko-Lokalisation von mGBP2 mit Autophagosomen.**

Die Ko-Lokalisation wurde am Konfokalmikroskop mit Präparaten von IFN- $\gamma$  stimulierten primären MEFs ermittelt, die mit dem  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum und dem  $\alpha$ -LC3 Antikörper gefärbt wurden. Die untere Reihe ist eine Vergrößerung der oberen Abbildungen (A). Primäre MEFs wurden im Vollmedium (VM) oder physiologischer Salzlösung (HBSS) für 24 h kultiviert und für 16 h mit IFN- $\gamma$  behandelt oder unstimuliert gelassen. Die Induktion von mGBP2 wurde mit dem  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum detektiert und die Induktion der Autophagie anhand der Spaltung von LC3 mit dem  $\alpha$ -LC3 Antikörper verfolgt (B).

Dies lässt die Vermutung zu, dass Autophagosomen Zielorganellen von mGBP2 darstellen können und gibt einen Hinweis auf eine mögliche intrazelluläre Funktion der Proteine, welche die Involvierung von mGBP2 im autophagosomalen Fluss implizieren könnte (Traver et al., 2011).

Ein weiteres Indiz auf die Interaktion von mGBP2 mit dem phagosomalen Membransystem liefern die Lipidassays mit Membrane Lipid Strips<sup>®</sup> (Echelon). Das Prinzip dieser Analyse ist die Bindung von Proteinen an biologisch aktive Lipide (z.B. Phosphoinositide (PI)), die punktförmig auf hydrophobe Membranen aufgetragen sind (Abb. 3.21 A). Hierfür wurden stabil mit dem GFP-mGBP2-WT Fusionskonstrukt oder dem GFP-Kontrollvektor transduzierte mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs mit IFN- $\gamma$  stimuliert, in einem hypotonischen Puffer mechanisch aufgeschlossen und das lösliche Protein von Zelltrümmern mittels Ultrazentrifugation separiert. Der Proteinüberstand wurde anschließend mit den in BSA blockierten Lipid-Streifen inkubiert. Die Detektion von mGBP2 erfolgte in Immunfärbungen mit dem  $\alpha$ -GFP Antikörper (Abb. 3.21 B). In der Lysatkontrolle wurde mGBP2 mit dem spezifischen  $\alpha$ -mGBP2 oder dem  $\alpha$ -GFP Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.21 C).



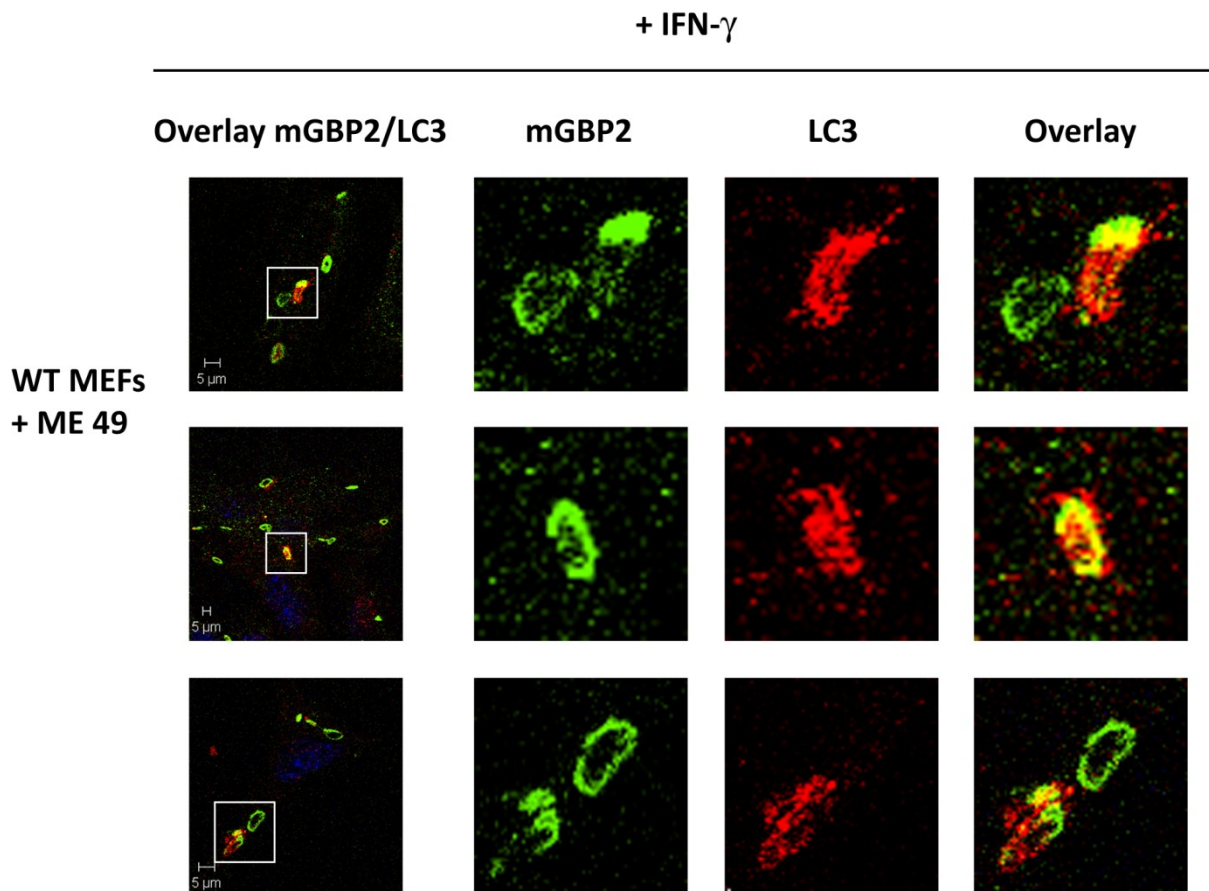
**Abb. 3.21: Interaktion von mGBP2 mit Lipiden.**

Schematische Darstellung des Beladungsmusters der Membrane Lipid Strips® (Echelon) (A). Stabil mit dem GFP-mGBP2-WT Fusionskonstrukt oder dem GFP-Kontrollvektor transduzierte mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit IFN- $\gamma$  stimuliert, im hypotonischen Puffer mechanisch aufgeschlossen und das lösliche Protein von Zelltrümmern mittels Ultrazentrifugation getrennt. Der Proteinüberstand wurde mit den, in BSA vorkontrollierten Membrane Lipid Strips®, inkubiert. Die Bindung der GFP-mGBP2-WT Moleküle an die auf die Strips aufgetragenen Lipide wurde in Immunfärbungen mit dem  $\alpha$ -GFP Antikörper detektiert.  $\infty$ : BSA-Negativkontrolle (B). In der Lysatkontrolle wurde mGBP2 mit dem spezifischen  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum oder dem  $\alpha$ -GFP Antikörper nachgewiesen (C).

Die Abbildung 3.21 zeigt eine deutliche Affinität von mGBP2 zu Phosphatidylinositolphosphaten (PIP) PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sind sowohl Bestandteile von Plasma-, als auch von neu entstandenen Phagosom- und Autophagosommembranen (Falkenburger et al., 2010).

Besonders interessant war in diesem Zusammenhang die Beobachtung der Akkumulation der Autophagosomen, identifiziert durch die Immunfärbung von LC3, in *T. gondii*

infizierten Zellen um die scheinbar aufgebrochene Membran der parasitophoren Vakuole (PVM) der Parasiten in IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen (Martens et al., 2005, Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Akkumulation von Autophagosomen um mGBP2 positive *T. gondii* PVMs.**

Primäre MEFs wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  behandelt und für 2 h mit dem ME49 Stamm von *T. gondii* infiziert. Die Zellen wurden mit dem  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum und dem  $\alpha$ -LC3 Antikörper gefärbt und die Ko-Lokalisation von mGBP2 und Autophagosomen an der PVM von *T. gondii* am Konfokalmikroskop LSM780 ermittelt.

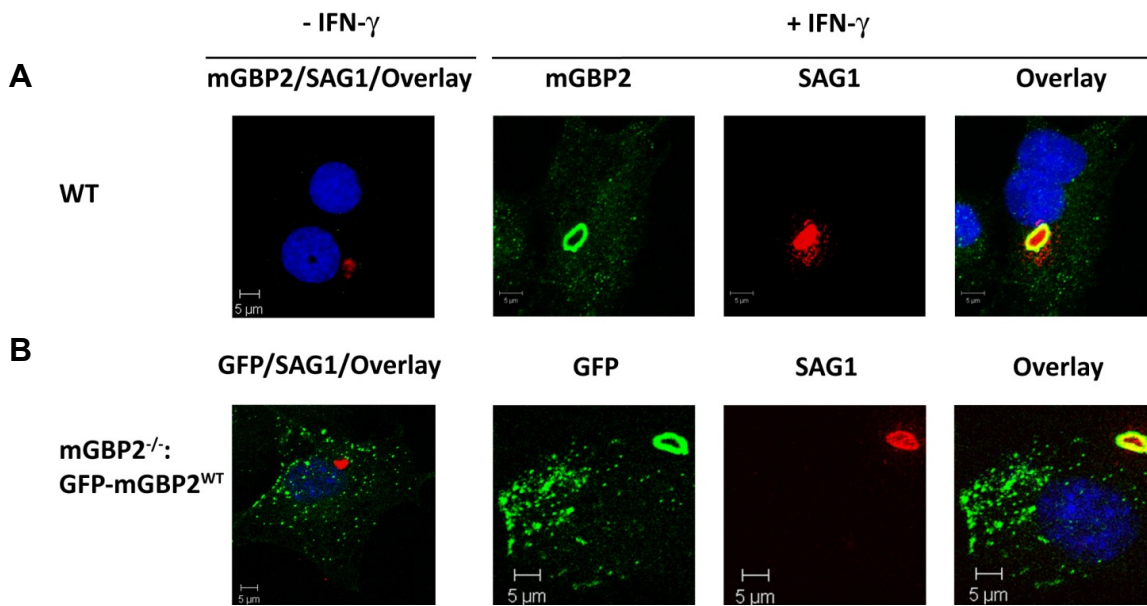
Aus früheren Studien ist bekannt, dass mGBPs, darunter auch mGBP2 zur parasitophoren Vakuole des avirulenten *T. gondii* Stammes ME49 rekrutieren (Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2012, eingereicht). So konnte in diesem Experiment die PVM anhand der Assoziation mit mGBP2-Molekülen am Konfokalmikroskop visualisiert werden. Toxoplasmen mit intakten PVMs wurden allerdings von der Autophagie-Maschinerie nicht erkannt. Ob die Akkumulation von Phagosomen um die Parasiten mit zerstörter PVM mGBP2 abhängig erfolgt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Indizien häufen, die auf eine Rolle von mGBP2 in Autophagie hindeuten.

### 3.5 Rolle von mGBP2 bei der Infektionsabwehr gegen *T. gondii*

*T. gondii* ist ein Parasit, der nahezu alle Zellen und Gewebe infiziert und häufig als Modellorganismus für intrazellulär replizierende protozoische Pathogene verwendet wird. In früheren Publikationen konnte mit Hilfe Gen-defizienter Mäuse einigen Mitgliedern der p47 GTPasen Familie (IRGs), wie *Irgm1* (LRG-47), *Irgd* (IRG-47) und *Irgm3* (IGTP), eine signifikante Bedeutung bei der Abwehr von *T. gondii* zugewiesen werden (Taylor et al., 2004; Martens and Howard, 2006). Kürzlich wurde gezeigt, dass mGBP2 für das Überleben von mit dem avirulenten Typ II ME49 Stamm von *T. gondii* infizierten Mäusen wichtig ist (Degrandi et al., 2012, eingereicht). Eine gesteigerte Expression von mGBP2 konnte sowohl auf der mRNA als auch auf der Proteinebene in Lunge und Leber von *T. gondii* infizierten Tieren detektiert werden (Degrandi et al., 2007). Über die molekulare Funktion von mGBP2 ist jedoch nur wenig bekannt.

#### 3.5.1 Subzelluläre Lokalisation von WT mGBP2 und GTPase-Mutanten nach *T. gondii* Infektion

Um den Einfluss von *T. gondii* auf die intrazelluläre Verteilung von mGBP2 zu untersuchen, wurden WT oder mit GFP-mGBP2-WT rekonstituierte mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs vor der Infektion für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert gelassen und für 2 h mit ME49 *T. gondii* (Verhältnis Zellen:Parasiten 1:50) inkubiert. Anschließend wurden WT MEFs endogen mit dem spezifischen Antiserum gegen mGBP2 gefärbt oder bei der stabil exprimierenden GFP-mGBP2-WT mGBP2<sup>-/-</sup> MEF Linie die GFP-Fluoreszenz für die Visualisierung der Proteine verwendet. Zur Detektion des Parasiten wurden die Zellen mit dem spezifischen Antikörper gefärbt, welcher das *T. gondii* Oberflächenprotein SAG1 detektiert. Die Lokalisation des endogenen mGBP2 oder des rekonstituierten Proteins und der Toxoplasmenoberflächenmembran wurde im Konfokalmikroskop analysiert (Abb. 3.23).



**Abb. 3.23: Subzelluläre Lokalisation von mGBP2 nach *T. gondii* Infektion.**

WT MEFs (A) wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen, mit dem ME49 Stamm von *T. gondii* infiziert und mGBP2 endogen angefärbt. Alternativ wurden mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, die stabil mit GFP-mGBP2-WT MEFs transduziert wurden (B), mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen und mit dem ME49 Stamm von *T. gondii* infiziert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop LSM510 angefertigt. Erste Spalte: endogenes mGBP2 mit dem  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum gefärbt und GFP-mGBP2-WT Fusionskonstrukt ohne IFN- $\gamma$ ; zweite Spalte: endogenes mGBP2 und GFP-mGBP2-WT Fusionskonstrukt mit 200 U/mL IFN- $\gamma$  stimuliert; dritte Spalte: *T. gondii* mit  $\alpha$ -SAG1 gefärbt; vierte Spalte: Überlagerung aus zweiter und dritter Spalte und Zellkernfärbung (DAPI) in blau.

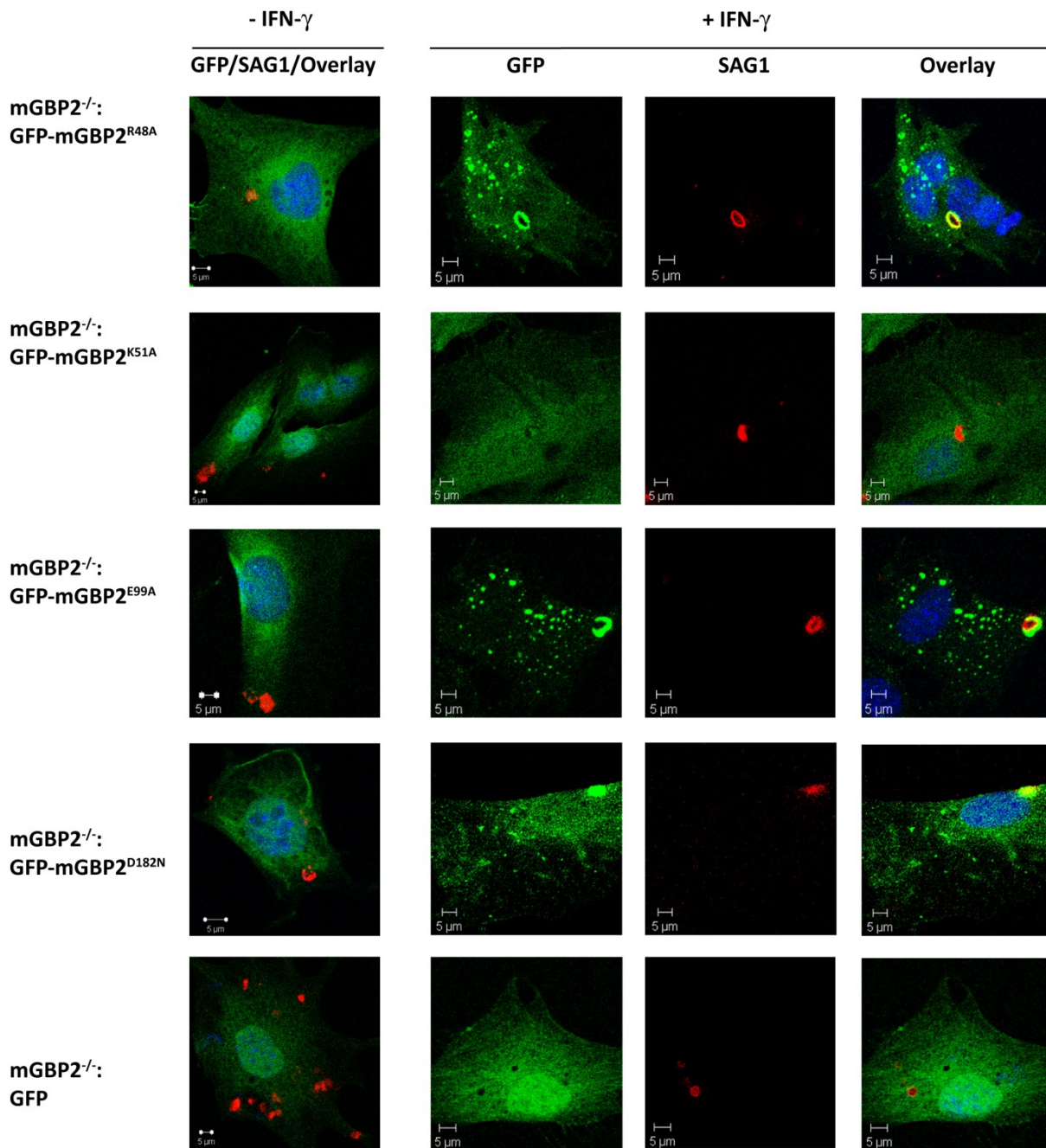
In unstimulierten Zellen bewirkte die parasitäre Invasion keine Änderung der subzellulären Verteilung von mGBP2, wohingegen in IFN- $\gamma$  vorstimulierten MEFs eine deutliche Ko-Lokalisation sowohl des endogenen mGBP2 als auch des rekonstituierten Fusionsproteins mit der PV des Parasiten nachgewiesen werden konnte, was durch die gelbe Farbe in der Überlagerung der LSM-Einzelbilder zu sehen ist. Das GFP-mGBP2-WT Protein rekrutierte dabei ebenso effizient zum Parasiten wie das endogene mGBP2 (Abb. 3.25). In früheren Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Akkumulation der mGBPs um die PV der Toxoplasmen ein gerichteter, Phagozytose-unabhängiger Prozess ist (Dissertation C. Konermann, 2008).

Um die Effizienz der Akkumulation von mGBP2 an der PV der Parasiten quantifizieren zu können, wurden die Rekrutierungsraten anhand von konfokalen Aufnahmen gezählt. Diese geben die Anzahl der mit mGBP2 assoziierten *T. gondii* als Prozentsatz der Gesamtzahl der intrazellulären Parasiten an. Die Abbildung 3.25 zeigt, dass etwa jeder zweite *T. gondii* mit mGBP2 assoziiert ist, und zwar sowohl mit dem endogenen als auch mit dem rekonstituierten WT Protein (s. auch Abb. 3.36). Diese Beobachtungen geben



abermals einen Hinweis darauf, dass das GFP-Konstrukt ein geeignetes Modell für die endogene Situation darstellt.

Um zu klären, ob die Assoziation von mGBP2 mit *T. gondii* durch dessen GTPase Funktion und Oligomerisierung beeinflusst wird, wurden mit GTPase-Mutanten von mGBP2 stabil transduzierte mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs 16 h mit IFN- $\gamma$  vorbehandelt oder unbehandelt gelassen und anschließend mit *T. gondii* infiziert. Die Parasiten wurden nach 2 h Infektion mittels Immunfärbung markiert und die Präparate am Konfokalmikroskop auf eine mögliche Ko-Lokalisation der mGBP2-Varianten mit dem Erreger untersucht. Die Aufnahmen zeigen unterschiedliches Rekrutierungsverhalten für die Mutanten nach IFN- $\gamma$  Stimulation der Zellen (Abb. 3.24).



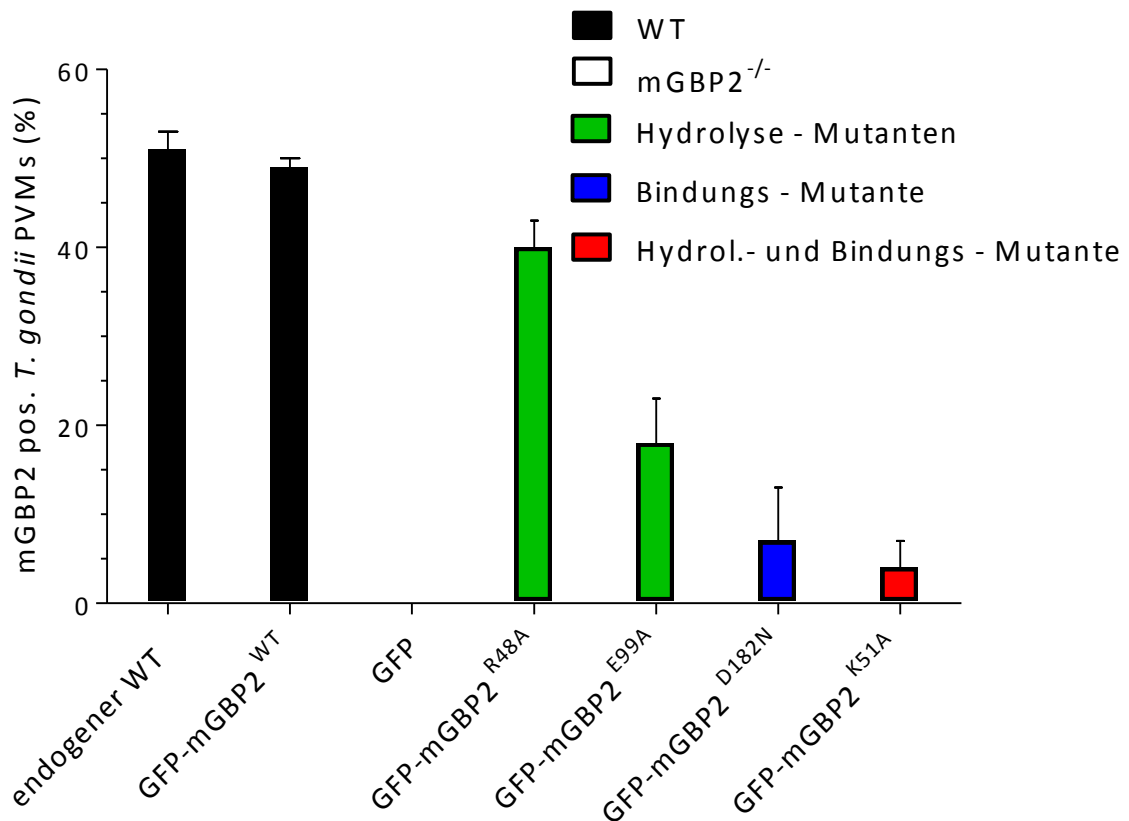
**Abb. 3.24: Subzelluläre Lokalisation der GTPase-Mutanten von mGBP2 nach Infektion mit *T. gondii*.**

Stabil transduzierte GFP-mGBP2-R48A, -K51A, -E99A und -D182N mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen, mit dem ME49 Stamm von *T. gondii* infiziert und nach 2 h mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Hierzu wurden die Zellen fixiert und die Toxoplasmen mit  $\alpha$ -SAG1 gefärbt. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop LSM510 angefertigt. Erste Spalte GFP-mGBP2-R48A, -K51A, -E99A und -D182N Fusionskonstrukte ohne IFN- $\gamma$ ; zweite Spalte: GFP-Fluoreszenz von Fusionskonstrukten mit IFN- $\gamma$ ; dritte Spalte: *T. gondii* mit  $\alpha$ -SAG1 gefärbt; vierte Spalte: Überlagerung aus zweiter und dritter Spalte und Zellkernfärbung (DAPI) in blau.

Die Mutante R48A, welche die Multimerisierung von mGBP2 und damit die Stimulation der Hydrolyse beeinträchtigt, zeigte mit einer 40%igen Assoziationsrate eine geringfügig reduzierte Rekrutierungsfähigkeit im Vergleich zum WT Protein, wohingegen die Switch II Mutante E99A, die während der Hydrolyse-Reaktion enzymatisch gehemmt ist, eine



zahlenmäßig deutlich verringerte Ko-Lokalisation mit der PV der Parasiten aufwies (18%) (Abb. 3.25). Die Relokalisationskapazität der Bindungsmutante im G4 Motiv, D182N, war um fast eine Ordnungsgröße schwächer als die des WT Proteins (7%) und die K51A Mutante verursachte, aufgrund der biochemischen Dysfunktion, eine beinahe komplette Rekrutierungsunfähigkeit (4%) von mGBP2 zum Erreger. Als Negativkontrolle zeigte das GFP-Protein keinerlei Assoziation mit *T. gondii* (Abb. 3.24, 3.25).



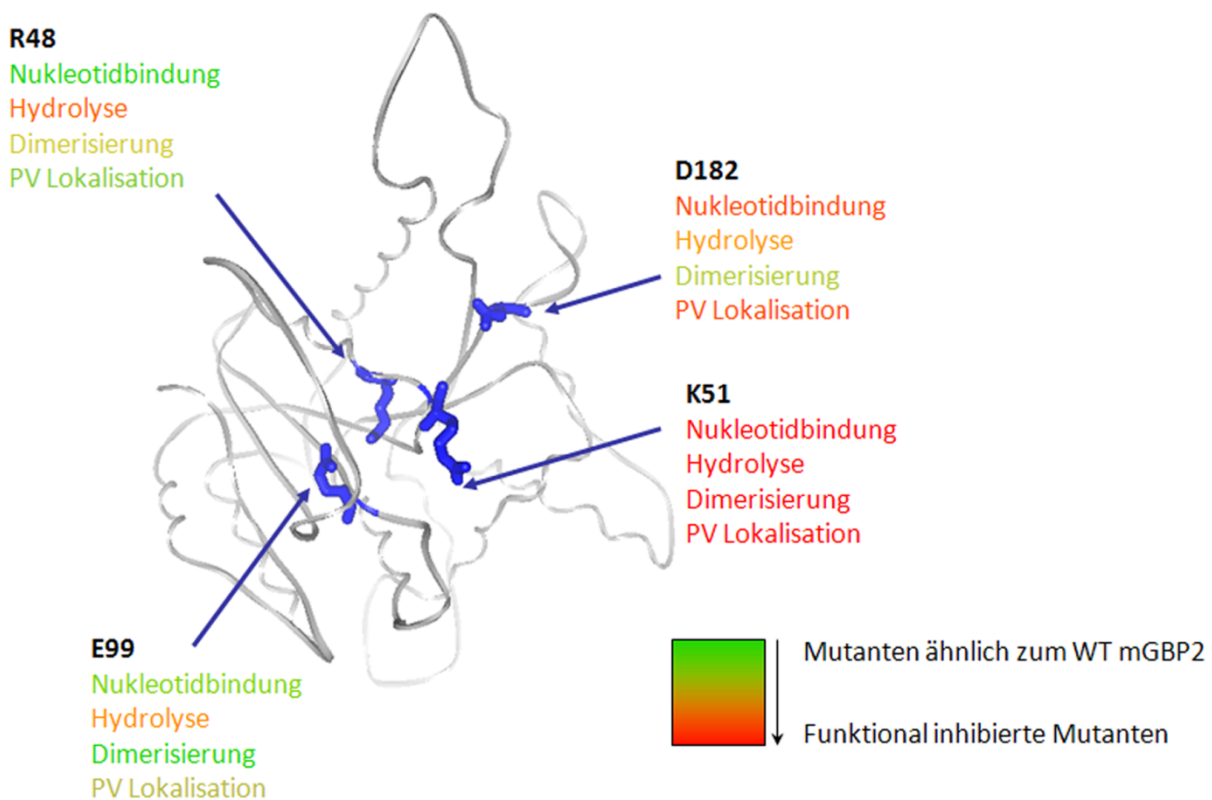
**Abb. 3.25: Rekrutierungsraten des WT Proteins und der GTPase-Mutanten von mGBP2 nach Infektion mit dem ME49 Stamm von *T. gondii*.**

Zur Ermittlung der Rekrutierungsraten wurden mGBP2 positive *T. gondii* PVMs 2 h nach Infektion (s. Abb. 3.23, 3.24) gegen die Gesamtzahl der intrazellulären PVMs in IFN- $\gamma$  vorstimulierten, stabil exprimierenden GFP-mGBP2-WT, -R48A, -K51A, -E99A und -D182N mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, ins Verhältnis gesetzt. GFP exprimierende Zellen dienten als mGBP2<sup>-/-</sup> Kontrolle.

Wie bereits für das WT Protein gezeigt, konnte für keines der Mutanten-Konstrukte eine Assoziation mit *T. gondii* in nicht vorstimulierten Zellen beobachtet werden (Abb. 3.24). Diese Ergebnisse legen den Schluss nah, dass für die Relokalisation von mGBP2 zu invadierten *T. gondii* weitere IFN- $\gamma$  induzierbare, Effektormoleküle erforderlich sind. Es zeigte sich außerdem, dass die kooperative GTPase-Aktivität von mGBP2 für eine effiziente Rekrutierung zur Oberfläche von Parasiten von essentieller Bedeutung ist und

dass die Anordnung der Proteine in vesikulären Strukturen die Voraussetzung für einen aktiven Transport von mGBP2 zum Parasiten darstellt.

Zusammenfassend, es wurden Mutanten in der GTPase-Domäne von mGBP2 mit individuellen Defekten bei der Guanin-Nukleotidbindung, der GTP-Hydrolyse sowie bei der Multimerisierung generiert und charakterisiert. Die biochemischen und immunzytochemischen Daten demonstrieren, dass die Fähigkeit Multimere zu bilden und die kooperative GTPase-Aktivität essentiell für die Lokalisation von mGBP2 in vesikelartigen Strukturen sind. Diese Strukturen stellen eine Voraussetzung für die IFN- $\gamma$  abhängige Rekrutierung von mGBP2 zur PV von *T. gondii*. Die aus den beschriebenen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse sind in der Abbildung 3.26 zusammengefasst.



**Abb. 3.26: Schematisches Diagramm der biochemischen und immunologischen Eigenschaften der GTPase-Mutanten von mGBP2.**

Das Diagramm fasst die biochemischen und immunologischen Eigenschaften der GTPase-Mutanten von mGBP2, bezugnehmend auf die Nukleotidbindung, Dimerisierung und PV Lokalisation, zusammen.

## **3.6 Funktion der mGBP2-Domänen**

### **3.6.1 Die Isoprenylierungsmutante von mGBP2**

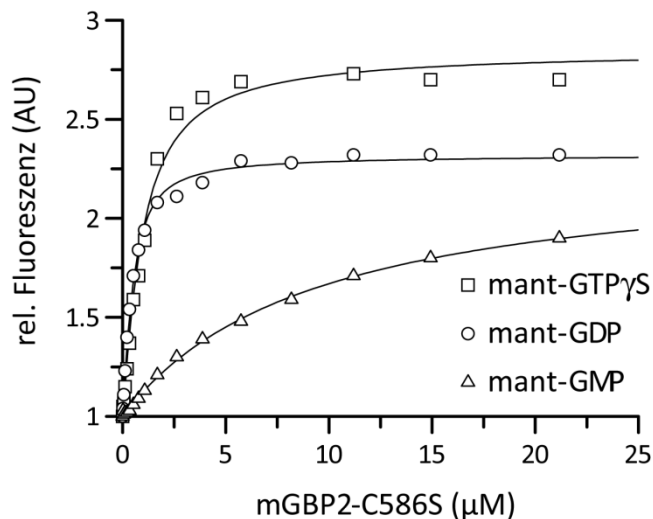
Zahlreiche Proteine tragen in ihrer Primärsequenz Erkennungsmotive, welche die Lokalisation des Genprodukts in subzellulären Kompartimenten oder Membranen bestimmen. Die CaaX Sequenz in der C-terminalen Domäne von mGBP2 stellt ein Erkennungsmotiv für die Geranylgeranyltransferase I dar, welche das Protein posttranslational modifiziert (Stickney and Buss, 2000). Die kovalente Anheftung eines Terpen-Restes ist ein Mechanismus, um Membranassoziation der Proteine zu vermitteln und damit ihre Relokalisation und biologische Funktion zu regulieren. In früheren Publikationen wurde in einem Überexpressionssystem gezeigt, dass das, am zu isoprenylierenden Cystein, zu Serin mutierte mGBP2 (C586S), nicht mehr durch die kovalente Anbindung einer Isoprenyleinheit modifiziert werden kann und seine typische subzelluläre Verteilung verliert (Vestal et al., 2000; Dissertation C. Konermann, 2008). Im Folgenden sollten sowohl biochemische als auch anti-mikrobielle Eigenschaften dieser Mutante charakterisiert werden.

### **3.6.2 Die biochemischen Eigenschaften der Isoprenylierungsmutante von mGBP2**

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Punktmutation an der Isoprenylierungsstelle von mGBP2 die katalytischen Eigenschaften und das Oligomerisierungsverhalten beeinflusst. Hierfür wurde das an eine His<sub>6x</sub>-Markierung gekoppelte mGBP2-C586S Protein, wie in 3.3.1 beschrieben, mittels Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie gereinigt.

#### **3.6.2.1 Nukleotid-Bindungsaffinitäten von mGBP2-C586S**

Die Nukleotidbindung wurde photometrisch anhand der Erhöhung der relativen Fluoreszenz der gebundenen mant-Nukleotide mit steigender Proteinkonzentration gemessen (Abb. 3.27).



**Abb. 3.27: Fluoreszenztitration der Bindung von mant-Nukleotiden an mGBP2-C586S.**

Je 0,5  $\mu\text{M}$  mant-Nukleotid: mant-GTP $\gamma$ S, mant-GDP und mant-GMP wurden im Puffer D (s. 2.3.1) bei 25 °C vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen mGBP2-C586S bis zur Sättigung titriert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 355 nm, die Emissionsmessung bei 448 nm. Die Anpassung einer Wurzelfunktion an die Daten (siehe 2.10.16) lieferte eine Dissoziationskonstante von 0,50  $\mu\text{M}$  für mant-GTP $\gamma$ S, 0,45 für mant-GDP und 15,5 für mant-GMP.

Die Bindungsaffinitäten wurden durch die Anpassung von quadratischen Gleichungen an die Datenkurven bestimmt (s. 2.10.16). Die Abbildung 3.27 zeigt die Titration von mGBP2-C586S mit GTP-Analogen mant-GTP $\gamma$ S, mant-GDP, mant-GMP. In Tabelle 3.3 sind die Daten der Bindungsmessungen für die C586S-Mutante vergleichend zum mGBP2-WT zusammengefasst.

**Tabelle 3.3: Fluoreszenztitration von mant-Nukleotiden nach der Bindung an mGBP2-WT und -C586S.**

$K_D$  ist die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation. Alle Messungen wurden in 0,5  $\mu\text{M}$  mant-Nukleotid im Puffer D (s. 2.3.1) bei 25°C durchgeführt.

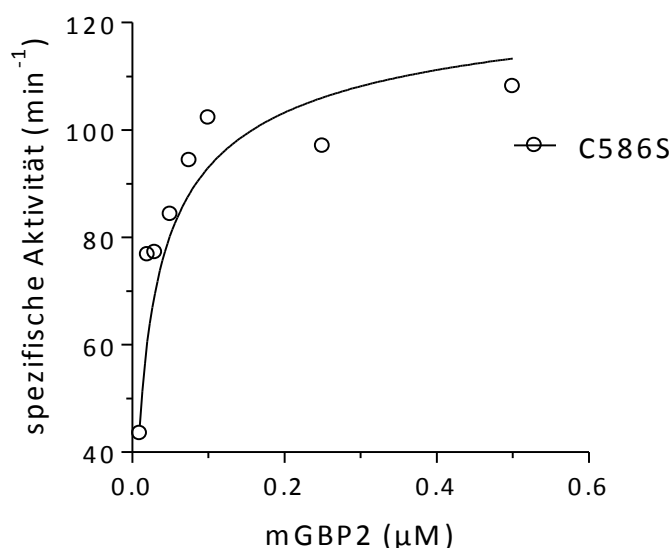
	mant-GTP $\gamma$ S	mant-GDP	mant-GMP
	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>WT</b>	0,45 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,04	14,4 $\pm$ 2,84
<b>C586S</b>	0,50 $\pm$ 0,08	0,45 $\pm$ 0,04	15,5 $\pm$ 3,05

Die Punktmutation am Cystein zeigte keine Auswirkungen auf die Bindung von mant-GTP $\gamma$ S und mant-GDP. Die Affinitäten zu diesen beiden Nukleotiden waren, wie beim WT, fast identisch. Die Interaktion mit mant-GMP war vergleichbar zum WT, um eine Größenordnung schwächer. Interessant war die geringere Gesamtfluoreszenz bei der Bindung von mant-GDP. Die Kristallstruktur von hGBP1 zeigt eine Rückfaltung der C-terminalen Domäne zur G-Domäne (Prakash et al., 2000a; Vopel et al., 2009). Das entsprechende Cystein im CaaX Motiv konnte aber aufgrund der Flexibilität dieser Region nicht aufgelöst werden, wird aber zum Lösungsmittel exponiert vorliegen (Vopel et al., 2009). Eine zusätzliche negative Ladung der Mutante in diesem Bereich könnte

möglicherweise einen indirekten Einfluss auf die Abschirmung des an das Nukleotid gekoppelten mant-Fluorophors nehmen (Abstand von C-Terminus zum aktiven Zentrum ist etwa 35 Å, abgeschätzt am mGBP2 Strukturmodell, siehe Abb. 3.2 A). Aus den Proteintitrationsexperimenten folgt, dass unter zellulären Bedingungen die C586S-Mutante überwiegend im GTP-gebundenen Zustand vorliegen wird. Es sollte allerdings bedacht werden, dass alle heterolog exprimierte Konstrukte in dem verwendeten prokaryotischen Expressionssystem nicht posttranslational isoprenyliert werden. Ein möglicher Einfluss der kovalent gebundenen Fettsäure, auf die biochemischen Eigenschaften von mGBP2, sowie die potenzielle Membraninsertion des Proteins, kann daher momentan nicht ermittelt werden.

### 3.6.2.2 Kooperative Hydrolyse von mGBP2-C586S

Die katalytischen Eigenschaften der Isoprenylierungsmutante wurden in einer multiplen Umsatzkinetik unter Sättigungsbedingungen für die Ausbildung eines GTP-gebundenen Dimers mit steigender Proteinkonzentration untersucht. Die Produkte der Hydrolyse-Reaktion wurden an einer reversed-phase HPLC-Apparatur chromatographisch aufgetrennt. Die, mit der Proteinkonzentration, ansteigende spezifische Aktivität weist auf die kooperative Stimulation der enzymatischen Aktivität hin (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28: Konzentrationsabhängigkeit der Hydrolyse von GTP durch mGBP2-C586S.**

Auftragung der spezifischen Aktivität der Hydrolyse von 1 mM GTP als Funktion der Konzentration an mGBP2-C586S. Die Anpassung einer Wurzelfunktion, die eine Dimerisierung beschreibt (s. 2.10.17) lieferte eine Dissoziationskonstante von 0,026 µM und eine maximale spezifische Aktivität von 133 min<sup>-1</sup>.

Ähnlich wie bei der Reaktion des WT Proteins, erfolgte die GMP-Bildung aus GTP in zwei aufeinanderfolgenden Schritten (Daten nicht gezeigt). Der Anteil von GMP betrug 72% (Tab. 3.4). Das Verhältnis aus der Hydrolyserate und der eingesetzten Proteinkonzentration lieferte die spezifische Aktivität. Die Anpassung einer

Wurzelfunktion, die eine Dimerisierung beschreibt (s. 2.10.17), an die Datenpunkte der Auftragung der spezifischen Aktivitäten gegen die Proteinkonzentration, bestimmte für die C586S-Mutante eine leicht erhöhte maximale spezifische Aktivität von  $133,10 \text{ min}^{-1}$ , mit einer Standardabweichung von  $15,89 \text{ min}^{-1}$ , und eine Dissoziationskonstante für das Dimer von  $0,026 \mu\text{M}$ , die mit dem Wert für den WT fast identisch ist.

**Tabelle 3.4: Konzentrationsabhängigkeit der GTP-Hydrolyse durch mGBP2-C586S.**

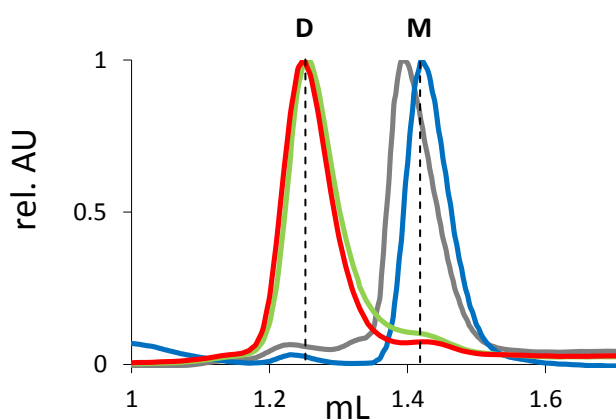
$V_{\text{max}}$  ist die maximale spezifische Aktivität der Hydrolyse von 1 mM GTP als Funktion der Konzentration von mGBP2. Die Anpassung der Daten an eine Wurzelfunktion (s. 2.10.17) beschreibt eine Dimerisierung des Proteins.  $K_D$  ist die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation des Proteindimers. Der Anteil von GMP am Produktverhältnis ist in der letzten Spalte aufgetragen. Alle Messungen wurden im Puffer D (s. 2.3.1) bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt.

	$V_{\text{max}} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	Dimer $K_D \text{ (}\mu\text{M)}$	GMP (%)
<b>WT</b>	$101,80 \pm 4,24$	$0,029 \pm 0,007$	74
<b>C586S</b>	$133,10 \pm 15,89$	$0,026 \pm 0,013$	72

Die Mutante kann GDP, ähnlich wie der WT, nicht als Substrat verwenden (Daten nicht gezeigt). Die Daten belegen, dass die Mutation am Isoprenylierungscystein die enzymatischen Eigenschaften von mGBP2 nicht beeinflusst.

### 3.6.2.3 Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2-C586S

Ob die Mutation die intermolekularen Wechselwirkungen nukleotidabhängig beeinflusst, sollte mittels Größenausschluss-Chromatographie analysiert werden. Die Guaninnukleotide wurden ausgehend von den Nukleotidaffinitäten in  $5 \mu\text{M}$  Konzentrationen für GTP $\gamma$ S und GDP sowie mit  $50 \mu\text{M}$  für GMP vorgelegt (Abb. 3.29).

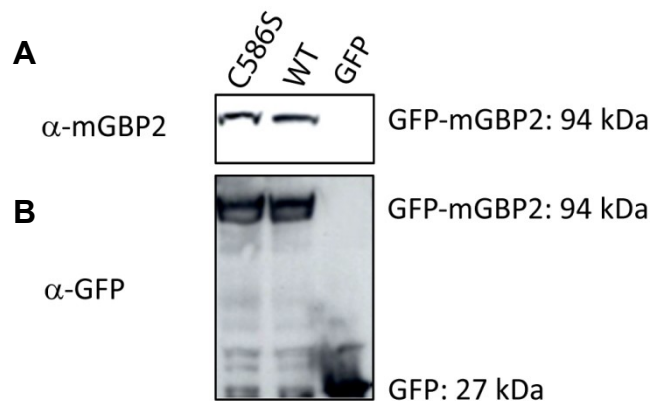


**Abb. 3.29: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2-C586S.**

$30 \mu\text{M}$  Protein wurden mit je  $5 \mu\text{M}$  GTP $\gamma$ S (-) bzw. GDP (-) sowie  $50 \mu\text{M}$  GMP (-) oder ohne Nukleotid (-) im Puffer D (s. 2.3.1) für 15 min auf Eis vorinkubiert und anschließend auf einer analytischen Größenausschluss-Chromatographiesäule, die mit dem identischen Puffer und Nukleotid äquilibriert war, aufgetrennt. Ohne Nukleotid, sowie in Gegenwart von GMP eluierte C586S als Monomer, in Gegenwart von GTP $\gamma$ S und GDP als Dimer. **D**: Dimer; **M**: Monomer.

Die Abbildung 3.29 zeigt, dass die Isoprenylierungsmutante in nukleotidfreiem und GMP gebundenem Zustand als Monomer und nach Bindung von GTP $\gamma$ S und GDP als Dimer vorlag. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Punktmutation des Cysteins in der CaaX Sequenz von nicht isoprenyliertem mGBP2 keine Änderung der biochemischen Eigenschaften induziert.

Die Lokalisation und die immunologische Funktion der C586S Punktmutante sollten in der rekonstituierten knockout Situation wie bei den GTPase-Mutanten untersucht werden (s. 3.6.4). Hierfür wurde zunächst das N-terminale GFP-mGBP2-C586S Konstrukt über einen lentiviralen Gentransfer stabil in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs integriert und die Expression geprüft (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30: Expression von GFP-mGBP2-WT und von GFP-mGBP2-C586S Isoprenylierungsmutante nach stabiler Transduktion von mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs.**







Die Zellen wurden für 16 h mit 100 U/mL IFN- $\gamma$  stimuliert, anschließend lysiert und der postnukleäre Überstand im Western Blot mit dem Antiserum gegen mGBP2 (**A**) oder dem Antikörper gegen GFP (**B**) analysiert. Dargestellt ist die Expression von GFP-mGBP2-WT, -C586S und GFP als Kontrolle. Es wurden jeweils 20  $\mu$ g Protein aufgetragen.

### 3.6.3 Herstellung der Trunktionsmutanten von mGBP2

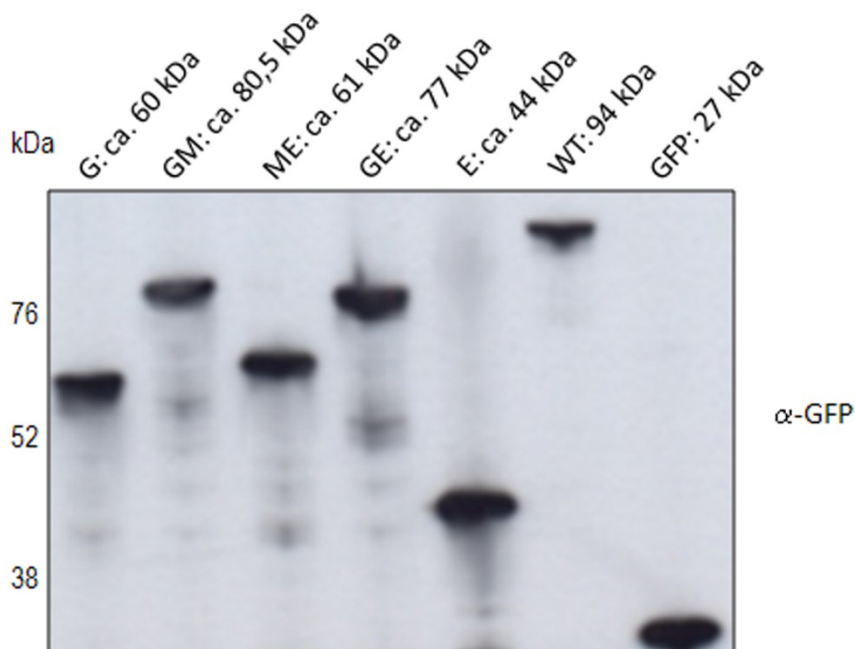
Die Funktion der einzelnen Domänen von mGBP2 sollte mit Hilfe von trunkierten Mutanten untersucht werden. Hierfür wurde das Protein in die N-terminale GTPase (G)-, die mittlere M- und die C-terminale GED (E)-Domäne anhand der Kristallstruktur des homologen hGBP1-Proteins (Prakash et al., 2000a) unterteilt und die entsprechenden Deletionsmutanten entworfen. Die DNS-Sequenzen der Domänen wurden mittels PCR aus einem Vektor, der die WT cDNS von mGBP2 enthält, amplifiziert (Abb. 3.31 A) und, wie schon zuvor der WT, in ein lentivirales Plasmid mit der N-terminal kodierte GFP-Sequenz über einen Restriktionsverdau und anschließende Ligation kloniert, komplett

sequenziert und die finalen Konstrukte in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs stabil transduziert. Die transduzierten Zellen wurden, basierend auf ihrer GFP-Fluoreszenz, sortiert, angereichert und kultiviert (Abb. 3.31 B).

### A

Domänen	Konstrukte	Aminosäure-Positionen	Nukleotid-Positionen
	WT	1-589	1-1770
	G	1-303	1-909
	GM	1-481	1-1443
	ME	304-589	910-1770
	E	482-589	1444-1770
	GE	1-303 + 482-589	1-909 + 1444-1770

### B



**Abb. 3.31: Herstellung und Expression von mGBP2 Trunktionsmutanten als N-terminale GFP-Proteine in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs.**

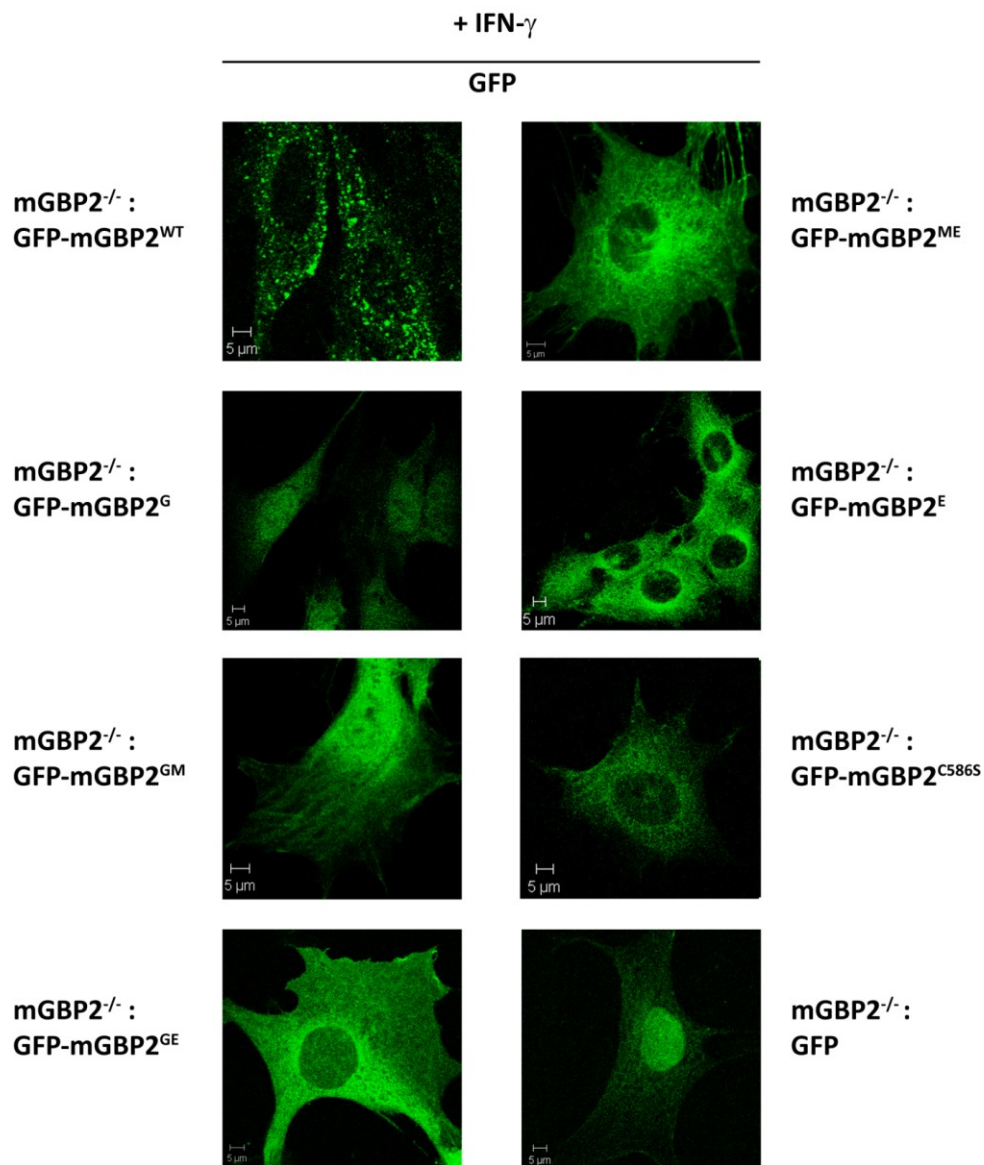
Die mGBP2 Deletetionsmutanten G, GM, GE, ME und E wurden anhand der Kristallstruktur von hGBP1 (PDB Eintrag 1DG3, Prakash et al., 2000a) entworfen (A). Die Gensequenzen wurden in ein lentivirales Plasmid mit der N-terminal kodierte GFP-Sequenz kloniert und in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs stabil transduziert. Die Genprodukte wurden im Western Blot mit einem  $\alpha$ -GFP Antikörper detektiert (B).



Die Abbildung 3.31 B zeigt die im Western Blot detektierten Genprodukte der Trunktionsmutanten. Das molekulare Gewicht der mGBP2-Proteine ist um ca. 27 kDa für das N-terminal konjugierte GFP-Protein, erhöht.

#### **3.6.4 Subzelluläre Lokalisation von Isoprenylierungs- und Trunktionsmutanten von mGBP2**

Es sollte die Rolle einzelner Domänen von mGBP2 für die subzelluläre Verteilung des Proteins in MEFs untersucht werden. Der bereits in der Literatur beschriebene Einfluss der Isoprenylierung auf die Proteinlokalisierung sollte in mGBP2 defizienten Zellen verifiziert werden (Vestal et al., 2000; Dissertation C. Konermann, 2008). Für die Ermittlung der subzellulären Lokalisation wurden mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, welche die GFP-Fusionskonstrukte der Isoprenylierungs- und Trunktionsmutanten stabil exprimierten, mit IFN- $\gamma$  stimuliert und nach 16 h wurde die Lokalisation der Genprodukte anhand der GFP-Fluoreszenz am Konfokalmikroskop untersucht (Abb. 3.32).



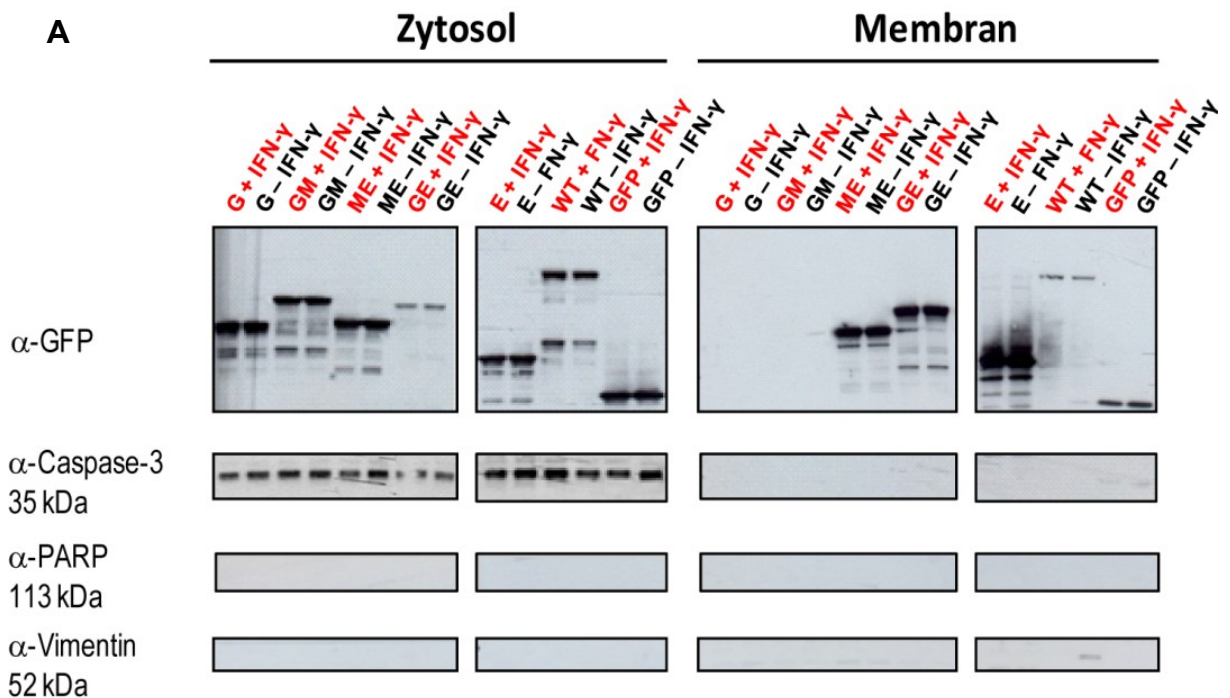
**Abb. 3.32: Subzelluläre Lokalisation von trunkierten Mutanten von mGBP2 in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs.**

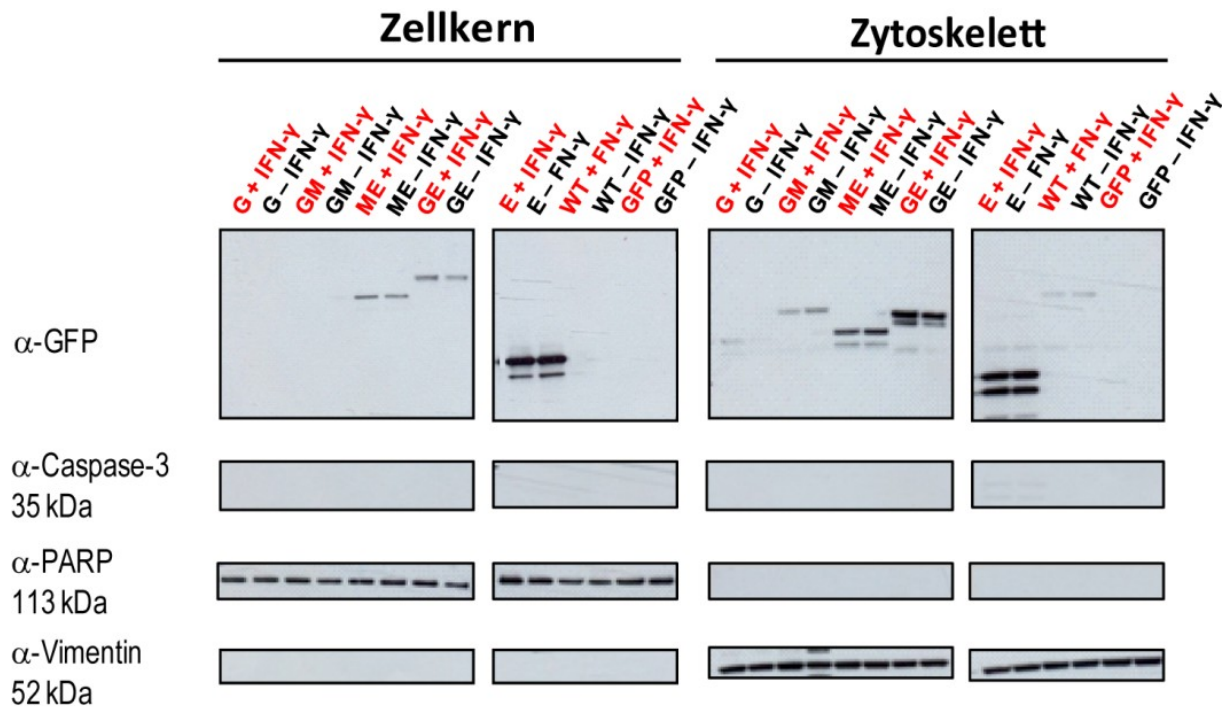
Die Zellen wurden 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert und anschließend die GFP-Fluoreszenz am Konfokalmikroskop LSM510 detektiert.

Alle Deletionsmutanten und die Isoprenylierungsmutante in stimulierten (Abb. 3.32) und in unstimulierten Zellen (Daten nicht gezeigt) lokalisierten nicht in vesikulären Strukturen. Die Mutanten ohne E-Domäne (G, GM) wurden überall in der Zelle vorgefunden, wohingegen die Mutanten mit E-Domäne, sowie die Isoprenylierungsmutante (GE, ME, E, C586S) homogen im Zytosol der Zellen verteilt waren. Die Mutanten GE, ME, E besitzen die Erkennungssequenz für die Geranylgeranyltransferase I und sind wahrscheinlich geeignete Substrate des Enzyms (Sinensky and Lutz, 1992; Stickney and Buss, 2000). Die homogene zytoplasmatische Anordnung der Mutanten legt die Schlussfolgerung nahe, dass alle drei Domänen für die korrekte intrazelluläre Lokalisation von mGBP2 erforderlich sind. Außerdem stellt der

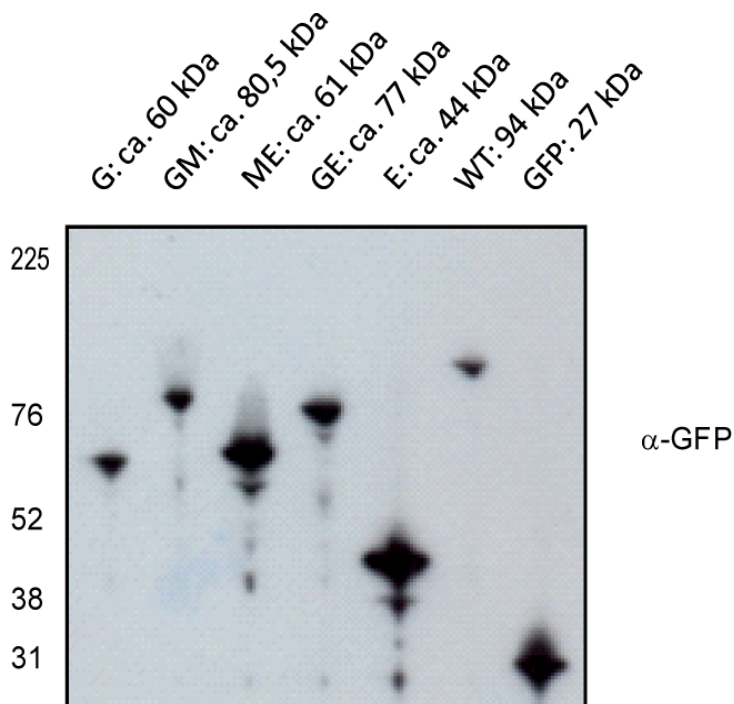
kovalent gebundene Terpenrest die Voraussetzung für die strukturierte vesikuläre Verteilung innerhalb der Zellen dar.

Die Rolle der einzelnen Domänen von mGBP2 auf die subzelluläre Lokalisation sollte mittels Zellfraktionierung weiter untersucht werden. Hierfür wurden mit Fusionskonstrukten des GFP-mGBP2-WT und der Trunktationsmutanten transduzierte mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen und die Zellysate mit dem ProteoExtract<sup>®</sup> Subcellular Proteome Extraction Kits (Calbiochem-Merck, s. 2.10.2), wie schon die GTPase-Mutanten, in vier Fraktionen aufgeteilt. GFP exprimierende Zellen dienten als Kontrolle. Die Detektion erfolgte über den  $\alpha$ -GFP Antikörper (Abb. 3.33).





B



**Abb. 3.33: Fraktionierung von GFP-Fusionsproteinen von WT und Trunktionsmutanten aus mGBP2 stabil exprimierenden mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs.**

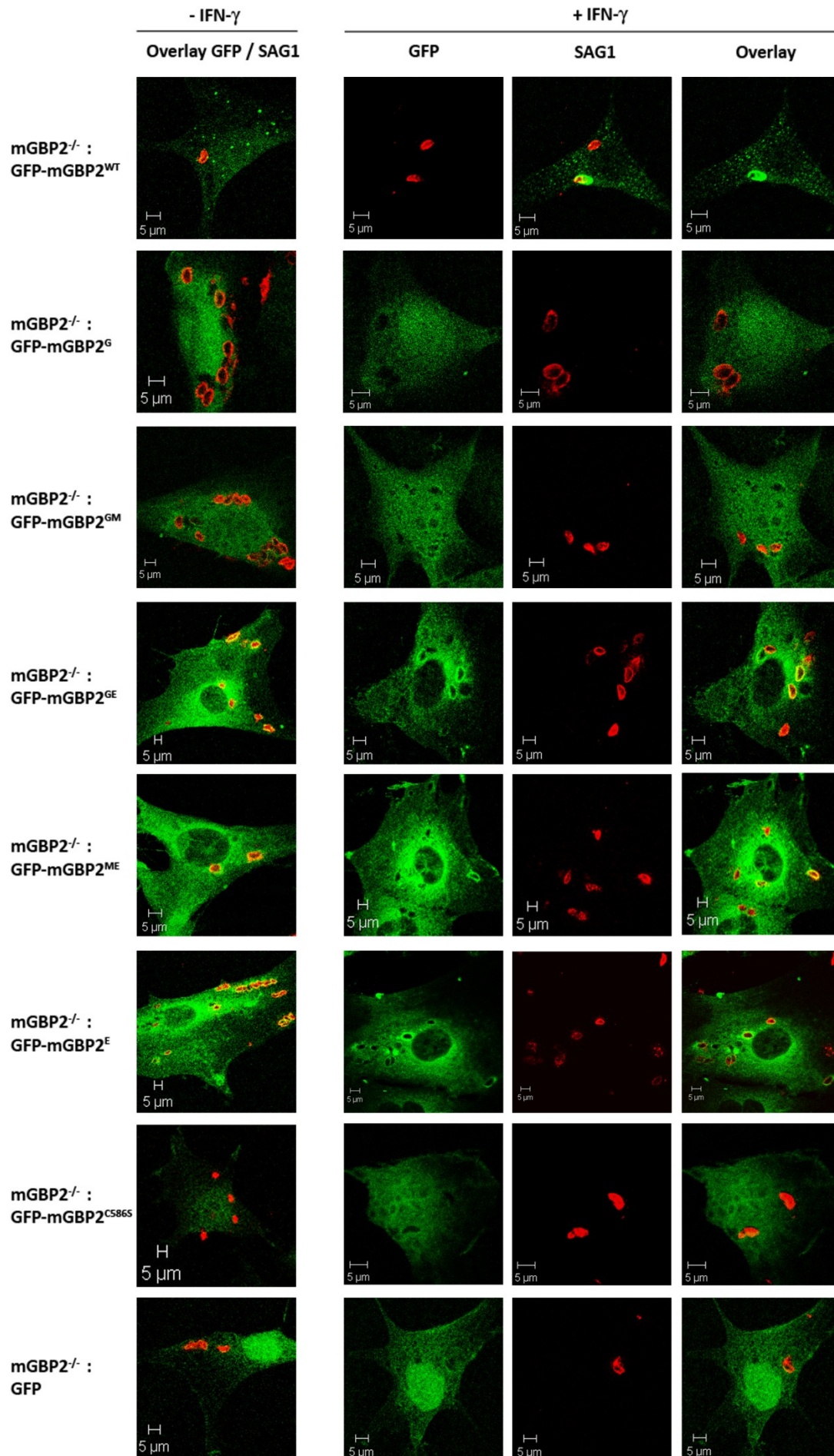
Zellen wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert (rote Schrift) oder unstimuliert gelassen und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers geerntet. Die Fraktionierung von  $1 \times 10^6$  Zellen ergab vier Fraktionen: Zytosol, Membran, Zellkern und Zytoskelett. Diese wurden auf SDS-Gelen aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Die Proteine wurden mit dem  $\alpha$ -GFP Antikörper detektiert. Als Fraktionskontrollen dienten  $\alpha$ -Caspase-3 für das Zytosol,  $\alpha$ -PARP-1 für den Zellkern und  $\alpha$ -Vimentin für das Zytoskelett (A). Zur Expressionskontrolle wurden nach IFN- $\gamma$  Stimulation zusätzlich Zellysate von allen Zellkulturen hergestellt und mit dem  $\alpha$ -GFP Antikörper gefärbt (B). Es wurden jeweils 20  $\mu$ L Protein aufgetragen.

Die Fraktionierung zeigte, dass trunkierte mGBP2 Proteine, die die E-Domäne enthalten, deutlich in der Membranfraktion detektiert werden konnten, wohingegen die beiden Mutanten ohne die C-terminale Domäne in der Membranfraktion kaum nachweisbar waren. Die Anwesenheit der Isoprenylierungsmutante in der Membranfraktion konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse gestatten den Schluss, dass die E-Domäne von mGBP2 für die Membraninteraktion notwendig und hinreichend ist.

### **3.6.5 Subzelluläre Lokalisation von Isoprenylierungs- und Trunktionsmutanten von mGBP2 nach *T. gondii* Infektion**

Die Funktion einzelner Domänen, sowie der Einfluss der Isoprenylierung von mGBP2 auf die zellautonome Immunantwort bei der Infektion mit *T. gondii* wurde in weiteren Versuchen ermittelt. Dabei wurde die Rekrutierungs- oder Assoziationskapazität der Proteine mit der PVM des Parasiten analysiert. Hierfür wurden die Fusionskonstrukte exprimierenden mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs vor der Infektion für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert gelassen und für 2 h mit dem ME49 Stamm von *T. gondii* (Zellen:Parasiten 1:50) inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und die Toxoplasmen mit dem  $\alpha$ -SAG1 Antikörper gefärbt. Die Detektion der Lokalisation der rekonstituierten mGBP2-Derivate erfolgte anhand der GFP-Fluoreszenz am Konfokalmikroskop (Abb. 3.34).

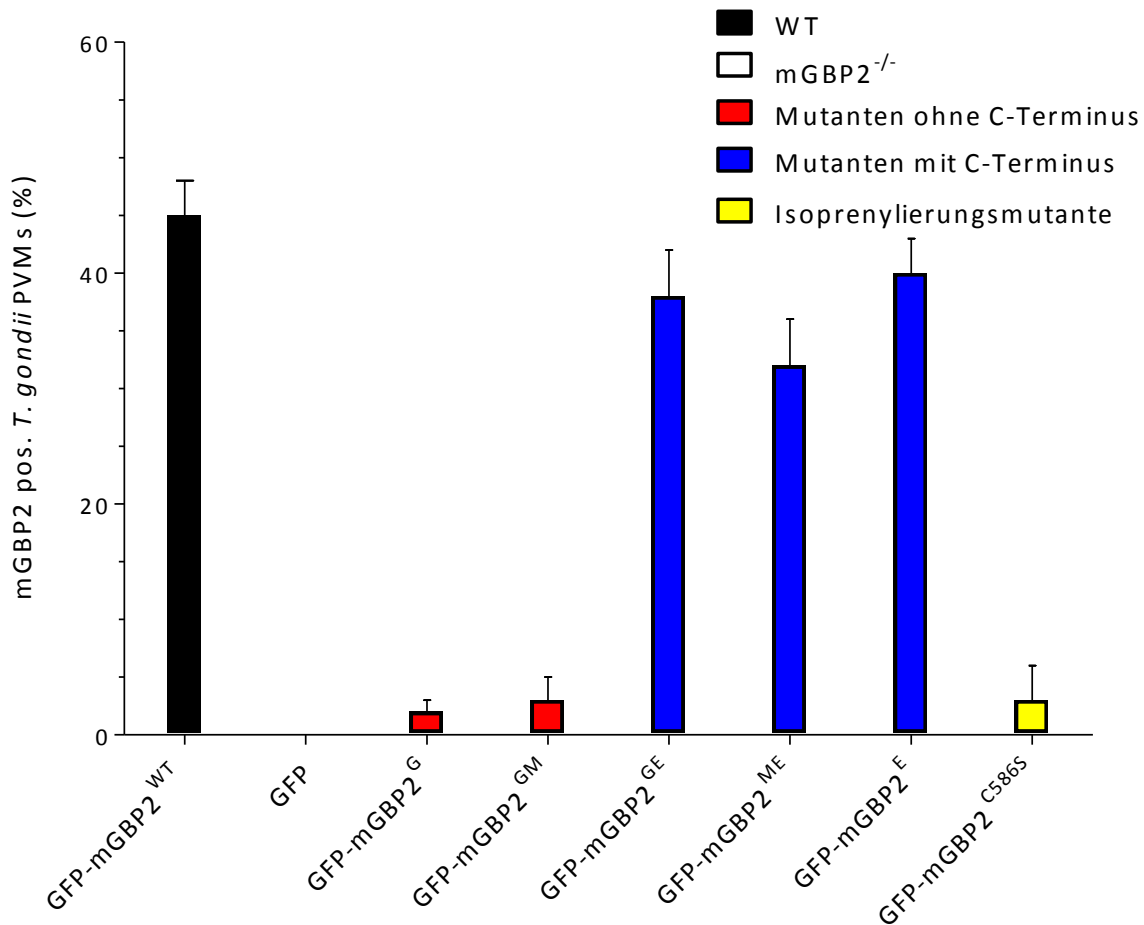




**Abb. 3.34: Subzelluläre Lokalisation der Isoprenylierungs- und von Trunktionsmutanten von mGBP2 nach *T. gondii* Infektion.**

GFP-mGBP2-WT, -C586S oder Trunktionsmutanten von mGBP2 stabil exprimierende mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen und mit *T. gondii* (ME49) für 2 h infiziert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop LSM510 angefertigt. Erste Spalte: GFP-mGBP2 Fusionskonstrukte ohne IFN- $\gamma$ ; zweite Spalte: GFP-mGBP2 Fusionskonstrukte mit IFN- $\gamma$ ; dritte Spalte: *T. gondii* mit  $\alpha$ -SAG1 gefärbt; vierte Spalte: Überlagerung aus zweiter und dritter Spalte.

Die Isoprenylierungsmutante und die beiden E-Domäne defizienten Mutanten G und GM zeigten nur geringfügige Assoziation mit *T. gondii*. Im Gegensatz dazu, akkumulierten alle E-Domäne enthaltenden Mutanten um die PVM des Parasiten 2 h nach Infektion, jedoch mit geringerer Effizienz als das GFP-mGBP2-WT Protein (Abb. 3.35). Interessanterweise erfolgte die Akkumulation der E-Domäne tragenden Mutanten an der PVM des Parasiten spontan. Im Gegensatz dazu war für die Rekrutierung der Vollängen-Proteine die Vorstimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$  erforderlich. Die Akkumulationsrate der E-Domäne Mutanten blieb indes IFN- $\gamma$  unabhängig (Daten nicht gezeigt). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Zielsequenz für die PVM von *T. gondii* in der E-Domäne kodiert ist und innerhalb der Struktur von WT mGBP2 verborgen bleibt, bis das Protein durch die Interaktion mit IFN- $\gamma$  induzierbaren Faktoren in seinen immunologisch aktiven Zustand überführt wird. Außerdem ist die Isoprenylierung für die Interaktion von mGBP2 mit der PVM essentiell (Abb. 3.35).

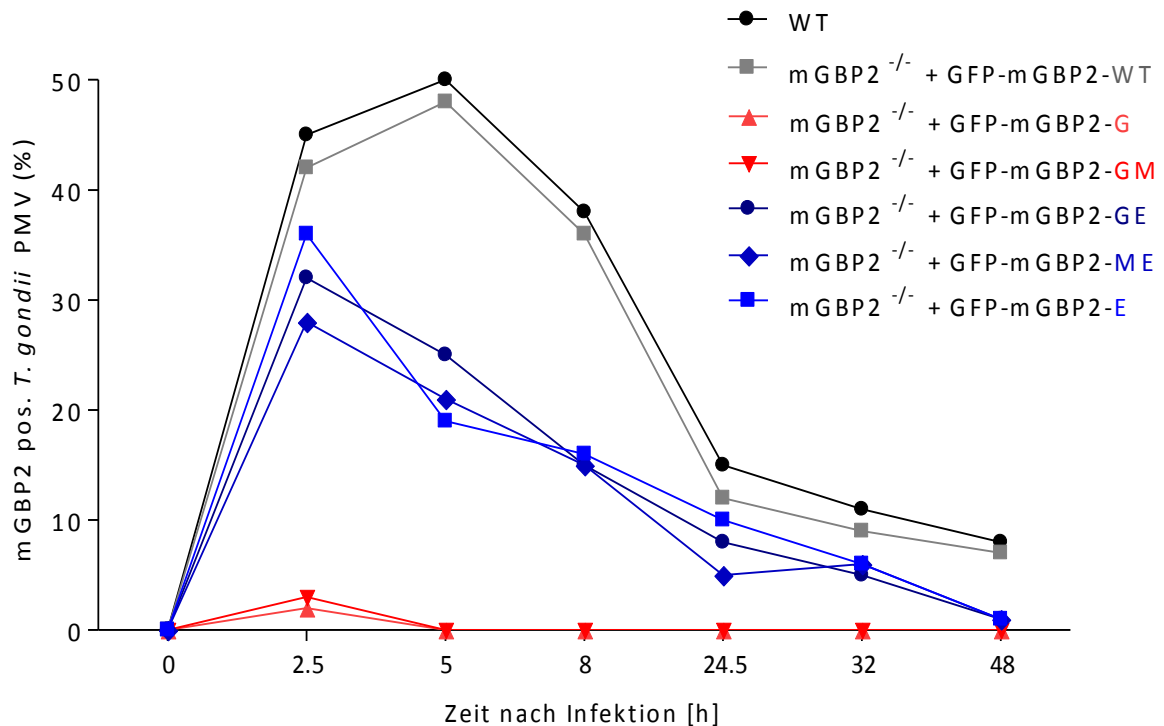


**Abb. 3.35: Assoziationsraten der GFP-Fusionsproteine von WT, der Isoprenylierungs- und der Trunktionsmutanten von mGBP2 nach Infektion mit dem ME49 Stamm von *T. gondii*.**

Zur Ermittlung der Rekrutierungsdaten wurden mGBP2 positive *T. gondii* 2 h nach Infektion (s. Abb. 3.34) gegen die Gesamtzahl der intrazellulären Parasiten in, mit IFN- $\gamma$  vorstimulierten, GFP-mGBP2-WT, -G, -GM, -GE, -ME, -E, und -C586S stabil exprimierenden mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, ins Verhältnis gesetzt. GFP exprimierende mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen dienen als Kontrolle.

Um die Rolle der N-terminalen Domänen (G und M) in der Effektorfunktion an der PVM von *T. gondii* im Verlauf der Infektion zu analysieren, wurde in WT MEFs oder in, mit GFP-Konstrukten transduzierten, mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen eine 48 h Infektionskinetik durchgeführt und der prozentuale Anteil der intrazellulären mGBP2 positiven *T. gondii* zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 3.36).





**Abb. 3.36: Assoziationsraten des WT Proteins und der Trunktionsmutanten von mGBP2 im Verlauf der Infektion mit *T. gondii*.**

Zur Ermittlung der Rekrutierungsrate wurden mGBP2 positive *T. gondii* 0; 2,5; 5; 8; 24,5; 32 und 48 h nach Infektion gegen die Gesamtzahl der intrazellulären Parasiten in, mit IFN- $\gamma$  vorstimulierten, WT MEFs oder GFP-mGBP2-WT, -G, -GM, -GE, -ME und -E stabil exprimierenden mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, ins Verhältnis gesetzt. GFP exprimierende mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen dienten als Kontrolle (nicht gezeigt).

Die Abbildung 3.36 zeigt, dass die Proteine bereits kurze Zeit nach Infektion an der PVM der Toxoplasmen lokalisierten. 2,5 h nach Infektion konnte nur eine schwache Abnahme der Ko-Lokalisation der E-Domäne tragenden Mutanten mit den Parasiten im Vergleich zum endogenen oder rekonstituierten WT von mGBP2 beobachtet werden. Den Höhepunkt der Rekrutierungseffizienz erreichte das WT Protein 5 h nach Infektion, wohingegen die E-Domäne enthaltenden Mutanten bereits deutlich seltener mit den Parasiten assoziiert vorlagen. Die Unterschiede in der Assoziationsrate waren für die Zeitpunkte 5 und 8 h für das WT Protein signifikant höher als für die trunkierten Mutanten mit der E-Domäne. Die Anzahl von mGBP2 assoziierten Erregern sank deutlich 24 h nach Infektion. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Toxoplasmen zu proliferieren und Rosetten auszubilden. Das WT Protein rekrutierte oder blieb an der PVM bis zum Zeitpunkt, an dem die Parasiten beginnen die Zelle zu verlassen, was in der Regel 48 h nach Infektion der Fall ist. Die Trunktionsmutanten waren zu diesem Zeitpunkt so gut wie nicht mehr an *T. gondii* zu detektieren. Bei dieser Infektionskinetik handelt es sich

um Momentaufnahmen, so dass eine genauere Aussage über eine andauernde Neurekrutierung oder Recycling der Proteine oder längeren Verbleib an der PVM, nicht gemacht werden kann. Zusammengenommen verifizieren die Daten die Hypothese, dass die E-Domäne notwendig und hinreichend für die Assoziation der Proteine mit der PVM ist und sie geben einen Hinweis darauf, dass die G- und M-Domänen von mGBP2 wichtige Funktionen für die Effizienz der Rekrutierung und die anhaltende Effektorfunktion an der PVM von *T. gondii* erfüllen.

Kürzlich publizierte Daten zeigen eine erhöhte Mortalität und höhere Zysten Zahlen in Gehirnen der mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse nach *T. gondii* Infektionen (Degrandi et al., 2012, eingereicht). Dies wirft die Frage nach der Rolle von mGBP2 in der zellautonomen Inhibition der *T. gondii* Proliferation auf. Um dieser Frage nachzugehen, wurden WT MEFs, sowie mit den GFP-Konstrukten des WT Proteins oder der Deletionsmutanten und mit GFP alleine rekonstituierte mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, mit den Toxoplasmen infiziert. Anschließend wurde Tritium (H<sup>3</sup>) markiertes Uracil ins Medium gegeben und die Toxoplasmenproliferation durch den Einbau von H<sup>3</sup>-Uracil ins Toxoplasmagenom autoradiographisch bestimmt. Dabei machte man sich die Tatsache zu Nutze, dass die Toxoplasmen Uracil in ihre DNS einbauen können, murine Zellen jedoch nicht (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977). Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied in *T. gondii* Proliferation zwischen den WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen mit dieser Methode festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurden WT und rekonstituierte MEFs mit Toxoplasmen infiziert und 32 h später die Präsenz von mGBP2 Proteinen an der PVM der Einzelparasiten und den replikativen Einheiten von mGBP2, den Rosetten, am Konfokalmikroskop untersucht. Zu diesem Zeitpunkt weisen über 90% der infizierten Zellen Rosetten auf (Abb. 3.37).

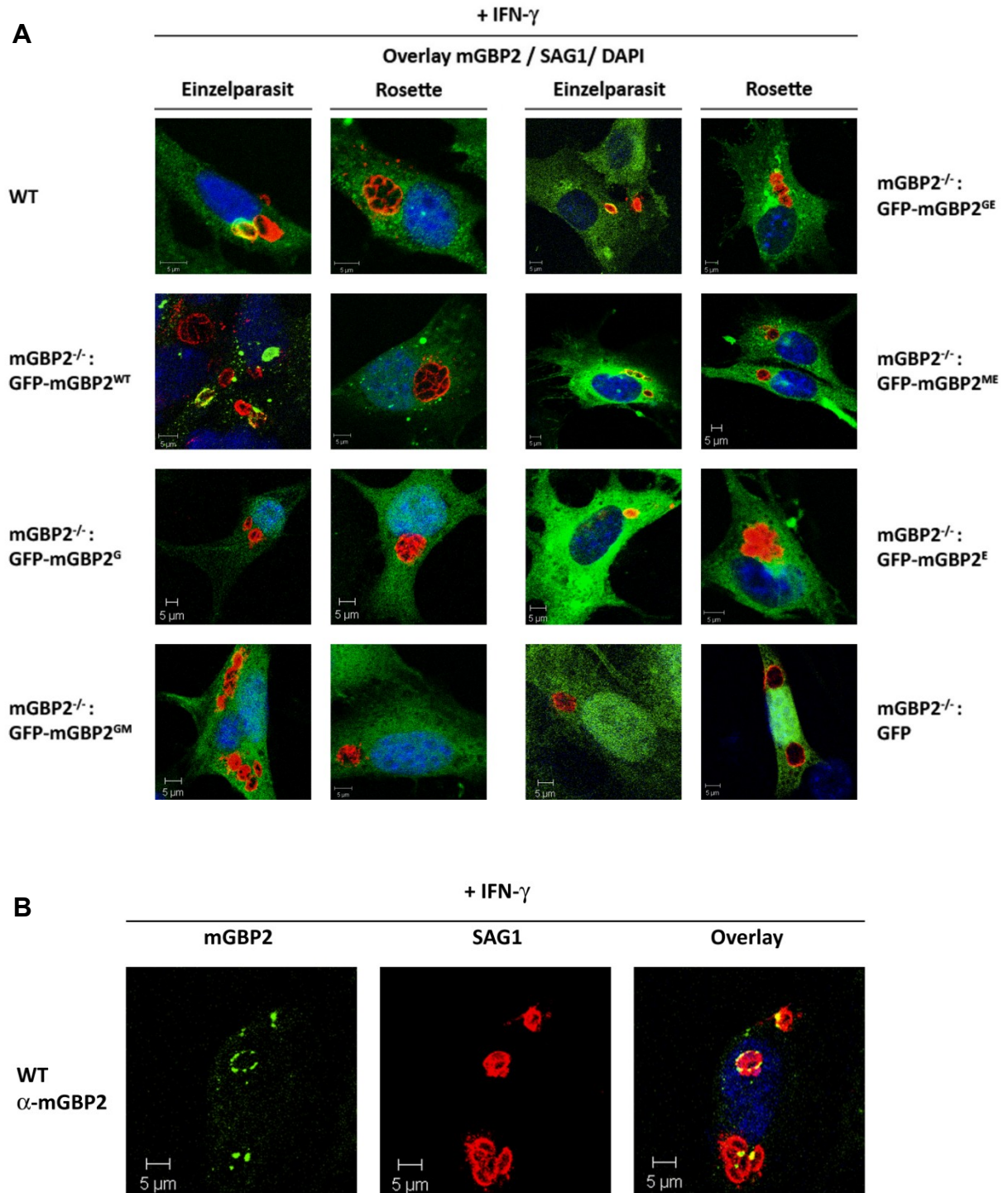
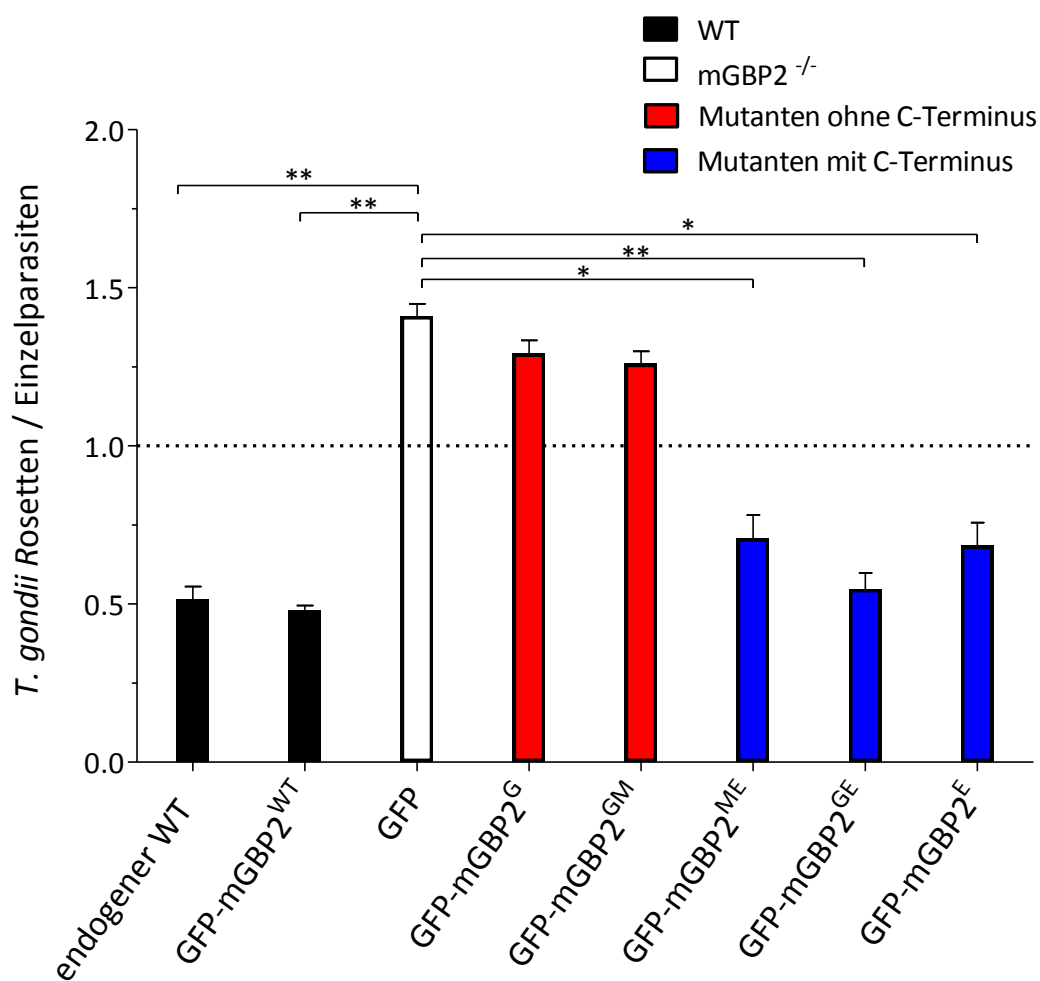


Abb. 3.37: Subzelluläre Lokalisation von WT und Trunktionsmutanten von mGBP2 32 h nach *T. gondii* Infektion.

mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, die stabil mit GFP, GFP-WT- oder Trunktionsmutanten von mGBP2 transduziert wurden (A) oder WT MEFs (B), wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* (ME49) für 32 h infiziert. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop LSM510 angefertigt. Endogenes mGBP2 wurde mit dem  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum und *T. gondii* wurden mit dem  $\alpha$ -SAG1 Antikörper gefärbt. (A) Erste Spalte: GFP-mGBP2 Fusionskonstrukte mit *T. gondii* Einzelparasiten; zweite Spalte: GFP-mGBP2 Fusionskonstrukte und *T. gondii* Rosetten. (B) Erste Spalte: endogenes mGBP2; zweite Spalte: *T. gondii* Einzelparasiten und Rosetten; dritte Spalte: Überlagerung von erster und zweiter Spalte. Die Kerne sind mit DAPI gefärbt (blau).

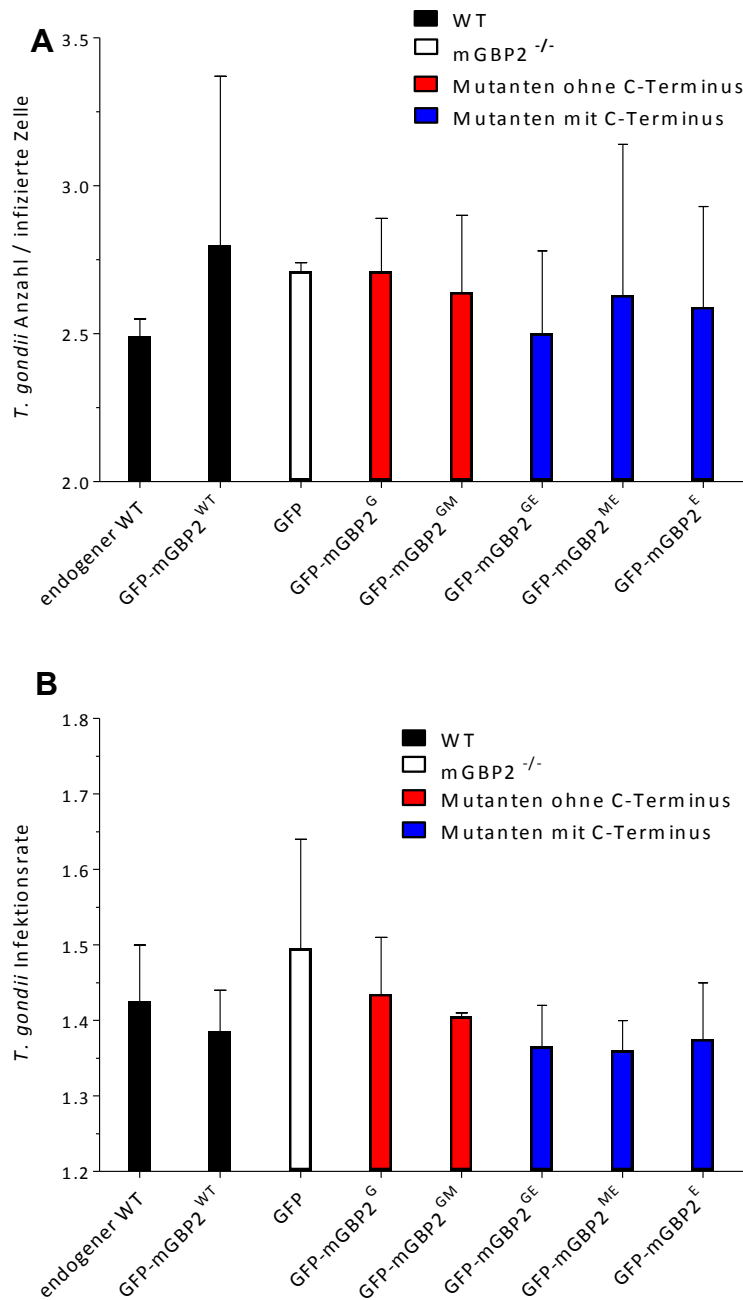
Die Abbildung 3.37 A zeigt, dass nur PVs, die Einzelparasiten beinhalteten eine Ko-Lokalisation mit endogenem (Abb. 3.37 B) oder rekonstituiertem mGBP2 (Abb. 3.38) oder den E-Domäne tragenden Deletionsmutanten aufwiesen, obwohl sich in mehreren Fällen Rückstände von mGBP2-Strukturen in der Nähe der Rosetten nachweisen ließen (Abb. 3.37 B). Daraus geht hervor, dass sich *T. gondii* Rosetten auszubilden beginnen, wenn sie nicht von mGBP2 umschlossen sind. Um zu klären, ob mGBP2 die Proliferation der Toxoplasmen hemmt, wurde das Verhältnis der Einzelparasiten zu Rosetten in den verschiedenen rekonstituierten Zelllinien und der GFP-Kontrollzelllinie bestimmt (Abb. 3.38).

A



**Abb. 3.38: *T. gondii* Proliferation in WT und mit GFP, GFP-mGBP2-WT oder mit Trunktionsmutanten von mGBP2 rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs 32 h nach *T. gondii* Infektion.**

Stabil GFP, GFP-mGBP2-WT oder Trunktionsmutanten von mGBP2 exprimierende mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* (ME49) für 32 h infiziert. Nach Fixierung der Zellen wurden *T. gondii* mit dem  $\alpha$ -SAG1 Antikörper gefärbt. Anhand der Konfokalaufnahmen wurden intrazelluläre Einzelparasiten und Rosetten gezählt. Die mGBP2 abhängige Inhibition basierend auf dem Verhältnis zwischen den Einzelparasiten und Rosetten wurde dargestellt (MW  $\pm$  Standardabweichung), n = 6, \*\*: p<0,005, \*: p<0,05.



**Abb. 3.39: Einfluss von mGBP2 auf die Infektiosität von *T. gondii*.**

Stabil GFP, GFP-mGBP2-WT oder Trunktionsmutanten von mGBP2 exprimierende mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* für 32 h infiziert. Nach Fixierung der Zellen wurden *T. gondii* mit dem  $\alpha$ -SAG1 Antikörper gefärbt. Anhand der Konfokalaufnahmen wurde die Anzahl der Parasiten pro Zelle (A) oder die Anzahl der infizierten Zellen gegenüber den uninfizierten gezählt (B). n = 6 Auswertungen (MW  $\pm$  Standardabweichung).

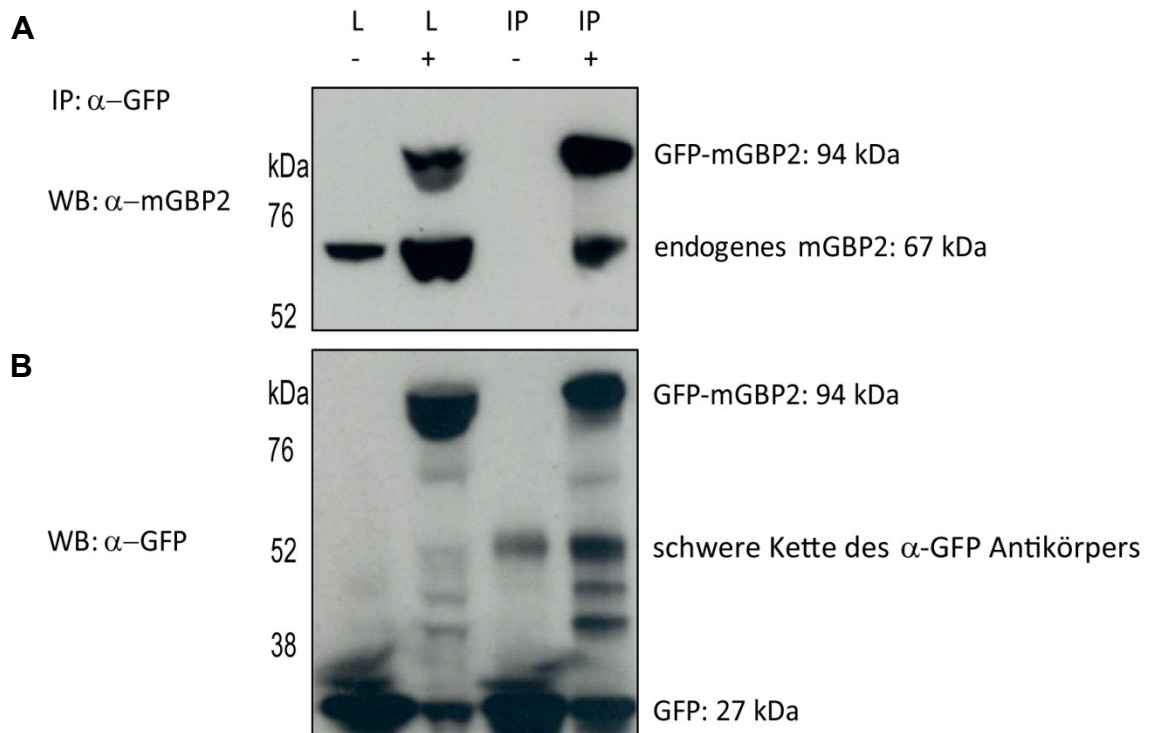
Die Abbildung 3.38 zeigt eine signifikant höhere Anzahl von Rosetten und damit eine erheblich höhere Replikation der Parasiten in mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu den WT oder mit GFP-mGBP2-WT rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs. Die Rekonstitution der mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen mit E-Domäne enthaltenden Trunktions-Konstrukten von mGBP2 führte zu einer partiellen Wiederherstellung des Niveaus an Einzelparasiten und damit zu einem intermediären Niveau der Replikationskontrolle. In Zellen mit Deletionsmutanten ohne E-Domäne hingegen, proliferierten die Toxoplasmen ähnlich stark wie in mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen. Der Verlust der mGBP2 Expression hatte aber keine Auswirkungen auf die Anzahl der Parasiten pro Zelle (Abb. 3.39 A) und ebenso wenig auf die Gesamtzahl der infizierten

Zellen (Abb. 3.39 B). Die Beobachtung, dass in den mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen 32 h nach Infektion immer noch eine gewisse Anzahl von Einzelparasiten zu detektieren war, könnte mit der Wirkung anderer mGBPs oder der IRG Proteine zusammenhängen (Hunn et al., 2008). Für das mGBP1 wurde die Ko-Lokalisation mit mGBP2 an denselben PVs von *T. gondii* nachgewiesen (Degrandi et al., 2012, eingereicht). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Rekrutierung von mGBP2 zur PVM von *T. gondii* in einer Inhibition der parasitären Replikation resultiert, indem die Proteine der Ausbildung von Rosetten entgegenwirken. Dieser Prozess wird durch die C-terminale Domäne des Proteins vermittelt, die die Zielsequenz für die Interaktion an der PVM beinhaltet.

### 3.7 Interaktionspartner von mGBP2

Die Akkumulation in vesikulären Strukturen ist, neben der bereits bekannten Abhängigkeit von der Isoprenylierung (Vestal et al., 2000 und diese Arbeit), ein von der GTPase-Funktion von mGBP2 abhängiger Prozess. Darauf weisen die Fehllokalisierung der GTPase-Mutanten in unstimulierten Zellen und eine partielle Wiederherstellung der Lokalisation in IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen hin (Abb. 3.16, 3.17). Ein möglicher Grund für die partielle Wiederherstellung der vesikulären Anordnung der G-Domäne-Mutanten könnte die Ausbildung von Heteromultimeren mit anderen IFN- $\gamma$  induzierbaren mGBPs sein. Zu diesem Zweck wurden in folgenden Experimenten direkte Wechselwirkungen zwischen mGBP2 und anderen mGBPs in Ko-Immunpräzipitationsexperimenten untersucht. Zunächst sollte der Nachweis der Homomultimerisierung der mGBP2-Moleküle auf zellulärer Ebene erfolgen. Hierfür wurden WT MEFs mit dem GFP-mGBP2-WT Fusionskonstrukt stabil transduziert.

Bei den Immunpräzipitationsexperimenten wurden mit Hilfe eines GFP-Antikörpers das überexprimierte Fusionsprotein und die möglichen Interaktionspartner an die Protein-G-Sepharose gekoppelt, unspezifische Bindungspartner abgewaschen und die gebundenen Proteine anschließend im Auftragspuffer von der Sepharose-Matrix eluiert. Im anschließenden Western Blot wurde die Interaktion zwischen dem GFP-Konstrukt und der endogenen mGBP2-GTPase mit dem spezifischen  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum detektiert (Abb. 3.40 A). Der Erfolg der spezifischen Bindung des GFP-Proteins an die  $\alpha$ -GFP-Sepharose wurde mit dem  $\alpha$ -GFP Antikörper nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die nur das GFP-Protein stabil exprimierten (Abb. 3.40 B).



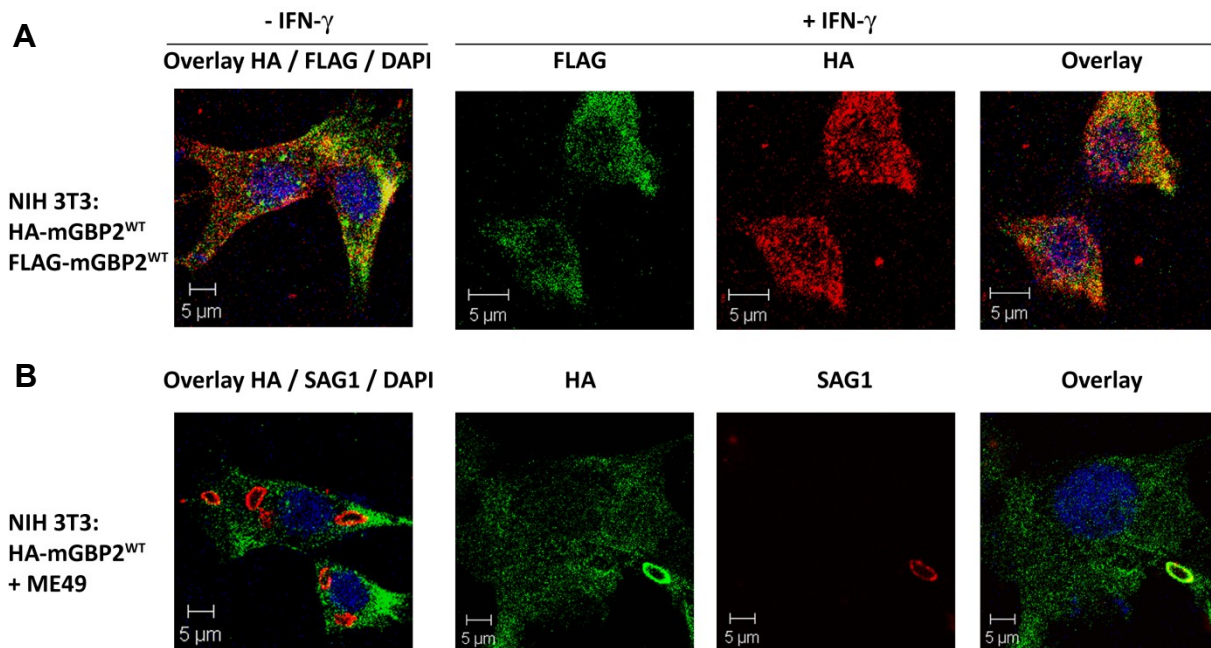
**Abb. 3.40: Ko-Immünpräzipitation von GFP-mGBP2 und endogenem mGBP2.**

GFP-mGBP2 stabil exprimierende MEFs wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert, um das endogene Protein zu induzieren. Mit dem  $\alpha$ -GFP Antikörper wurde das Fusionsprotein mit seinen Interaktionspartnern präzipitiert und an die Sepharose gekoppelt. Nach Waschen und Eluieren der Proteine wurde die Interaktion im Western Blot mit dem spezifischen  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum nachgewiesen (**A**). Die Präzipitationskontrolle erfolgte mit dem  $\alpha$ -GFP Primärantikörper und dem  $\alpha$ -Maus, mit HRP-gekoppelten, Sekundärantikörper (**B**). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur das GFP-Protein stabil exprimierten. +: WT MEFs transduziert mit GFP-mGBP2; -: WT MEFs transduziert mit GFP. L: Lysat; IP: Präzipitat.

Die Abbildung 3.40 zeigt die Ko-Immünpräzipitation des endogenen Proteins mit dem GFP-mGBP2-WT Konstrukt und bestätigt, dass mGBP2-Moleküle unter physiologischen Bedingungen miteinander interagieren. Bei dem Elutionsschritt wurde der  $\alpha$ -GFP Antikörper von der Sepharose abgelöst, so dass die Ketten im Western Blot mit dem entsprechenden Zweitantikörper detektiert wurden.

Um zu prüfen, ob die Interaktion über die Dimerisierung von mGBP2 erfolgt und nicht GFP-abhängig ist, wurden NIH 3T3 Fibroblasten stabil mit einem N-terminal verknüpften Hämagglutinin (HA)-mGBP2 Fusionskonstrukt transduziert und zusätzlich transient mit einem ebenfalls N-terminal gekoppelten FLAG-mGBP2 Fusionskonstrukt transfiziert. Zunächst wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie die intrazelluläre Verteilung der beiden Fusionsproteine auf vesikuläre Anordnung und Ko-Lokalisation hin untersucht (Abb. 3.41 A).





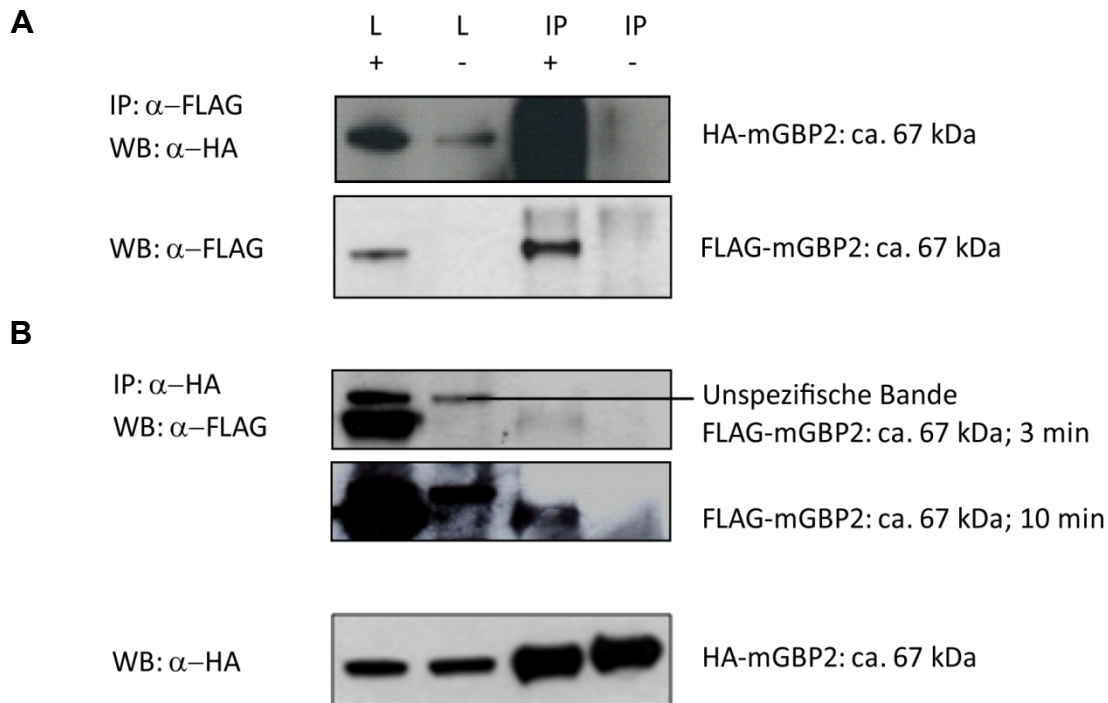
**Abb. 3.41: Ko-Lokalisation von HA-mGBP2 mit FLAG-mGBP2 in NIH 3T3 Fibroblasten und die Rekrutierung von HA-mGBP2 zu *T. gondii*.**

Stabil transduzierte HA-mGBP2 NIH 3T3 Fibroblasten wurden transient mit dem FLAG-mGBP2 Fusionskonstrukt transfiziert, 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen und anschließend mit den spezifischen  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -FLAG Antikörpern gefärbt, um eine Ko-Lokalisation der GTPasen festzustellen. Die Aufnahmen wurden am Konfokalmikroskop LSM510 angefertigt (**A**). Erste Spalte oben: HA-mGBP2 und FLAG-mGBP2 Fusionskonstrukte angefärbt mit  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -FLAG und Zellkernfärbung (DAPI) in blau ohne IFN- $\gamma$ , zweite Spalte oben: FLAG-mGBP2 Protein angefärbt mit  $\alpha$ -FLAG; dritte Spalte oben: HA-mGBP2 Protein angefärbt mit  $\alpha$ -HA; vierte Spalte oben: Überlagerung aus zweiter und dritter Spalte und Zellkernfärbung (DAPI) in blau mit IFN- $\gamma$ ; gelbe Färbung weist auf eine Ko-Lokalisation hin. Stabil transduzierte HA-mGBP2 NIH 3T3 Fibroblasten wurden mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen, für 2 h mit ME49 *T. gondii* infiziert (Zellen zu Parasitenverhältnis 1:30) und mit den spezifischen  $\alpha$ -HA- und  $\alpha$ -SAG1-Antikörpern gefärbt (**B**). Erste Spalte unten: HA-mGBP2 und Toxoplasmen angefärbt mit  $\alpha$ -HA und  $\alpha$ -SAG1 und Zellkernfärbung (DAPI) in blau ohne IFN- $\gamma$ , zweite Spalte unten: HA-mGBP2 Protein angefärbt mit  $\alpha$ -HA; dritte Spalte unten: Toxoplasmen angefärbt mit  $\alpha$ -SAG1; vierte Spalte unten: Überlagerung aus zweiter und dritter Spalte und Zellkernfärbung (DAPI) in blau mit IFN- $\gamma$ .

Die Abbildung 3.41 A zeigt eine Ko-Lokalisation der beiden GTPasen in vesikelartigen Kompartimenten. Diese subzelluläre Lokalisation ist, wie die des GFP-mGBP2-WT Konstrukts, IFN- $\gamma$  unabhängig. Außerdem rekrutierte das HA-gekoppelte mGBP2 zu intrazellulären Toxoplasmen nach IFN- $\gamma$  Stimulation (Abb. 3.41 B). Dies deutet auf die Funktionalität des Fusionsproteins hin. In Immunpräzipitationsexperimenten wurde nun die direkte Interaktion zwischen HA-mGBP2 und FLAG-mGBP2 Molekülen untersucht. Hierfür wurde, wie oben beschrieben, die HA-mGBP2 konstitutiv exprimierende NIH 3T3 Fibroblasten Zelllinie transient mit dem FLAG-mGBP2 kodierenden Vektor transfiziert, mit IFN- $\gamma$  stimuliert und die HA- bzw. FLAG-Fusionsproteine mit Interaktionspartnern mit Hilfe der  $\alpha$ -HA- bzw.  $\alpha$ -FLAG-Antikörper-gekoppelten Agarose (Sigma-Aldrich) aus dem Lysat der Zellen präzipitiert. Die GTPasen wurden dann nach



mehreren Waschrunden von der Agarose eluiert und die Proben auf ein 4-12% SDS-Gel geladen, um im Western Blot auf die reziproke Ko-Präzipitation hin untersucht zu werden (Abb. 3.42).



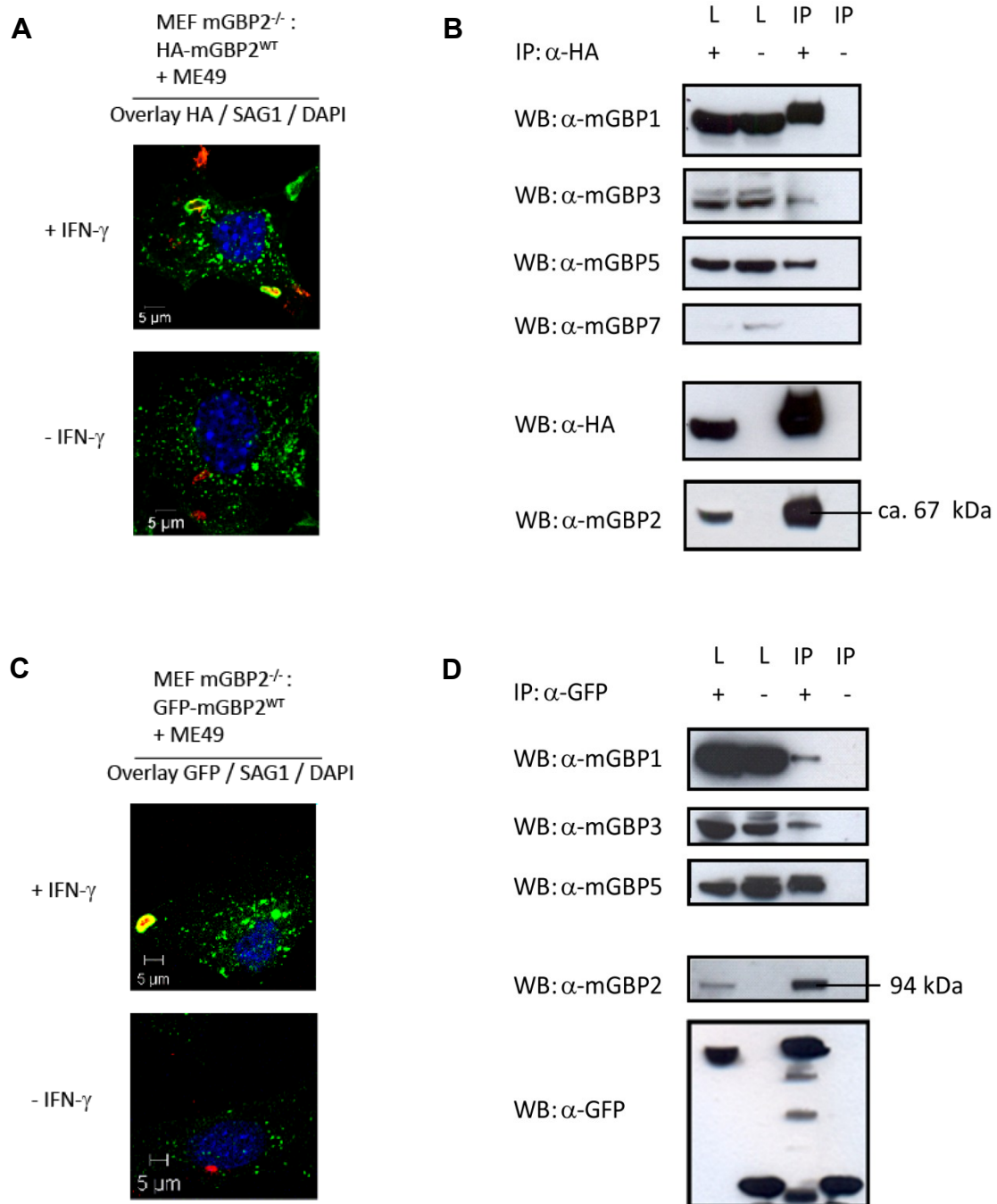
**Abb. 3.42: Ko-Immünpräzipitation von HA-mGBP2 und FLAG-mGBP2.**

HA-mGBP2 stabil exprimierende NIH 3T3 Fibroblasten wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Mit dem an die Agarose gekoppelten  $\alpha$ -FLAG (**A**) bzw.  $\alpha$ -HA (**B**) Antikörper wurde das jeweilige Fusionsprotein mit seinen Interaktionspartnern gezogen. Nach Waschen und Eluieren der Proteine wurde die Interaktion im Western Blot mit dem  $\alpha$ -HA (**A, erste Zeile**) bzw. dem  $\alpha$ -FLAG (**B, die ersten beiden Zeilen**) Antikörper nachgewiesen. Die Präzipitationskontrolle erfolgte mit dem  $\alpha$ -FLAG (**A, zweite Zeile**) bzw. dem  $\alpha$ -HA (**B, dritte Zeile**) Antikörper. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur das HA-mGBP2 stabil exprimierten. +: NIH 3T3 transduziert mit HA-mGBP2 und transfiziert mit FLAG-mGBP2; -: NIH 3T3 transduziert mit HA-mGBP2. 3 min, 10 min: Dauer der Filmbelichtung. L: Lysat; IP: Präzipitat.

In Abbildung 3.42 ist die gegenseitige Ko-Immünpräzipitation von FLAG- (Abb. 3.42 A) und HA-gekoppeltem mGBP2 (Abb. 3.42 B) dargestellt. HA-mGBP2 transduzierte Zellen dienten dabei als Negativkontrollen. Die Homomultimerisierung von mGBP2 konnte somit erneut verifiziert werden.

Mit Hilfe der GFP-mGBP2 bzw. HA-mGBP2 konstitutiv exprimierenden mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurde mGBP2 auf eine mögliche Interaktion mit den GTPasen mGBP1, 3, 5 und 7 untersucht (Abb. 3.43 B, D). Im Vorfeld wurden für beide mGBP2-Konstrukte sowohl eine vesikuläre Lokalisation als auch eine aktive Rekrutierung zu *T. gondii* überprüft (Abb. 3.43 A, C). Für die Immünpräzipitation wurden Zellen mit IFN- $\gamma$  stimuliert, Lysate

hergestellt und die Proteine mit  $\alpha$ -HA- bzw.  $\alpha$ -GFP-Antikörpern präzipitiert (Abb. 3.43 B, D).



**Abb. 3.43: Subzelluläre Lokalisation, Rekrutierung zu *T. gondii* und Immunpräzipitation von mGBPs mit HA-mGBP2 bzw. GFP-mGBP2.**

HA-mGBP2 (A, B) und GFP-mGBP2 (C, D) stabil exprimierende mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurden für 16 h mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Zur Funktionskontrolle wurden die HA-mGBP2 exprimierenden Zellen mit dem  $\alpha$ -HA Antikörper gefärbt (A) und beide Zelllinien, HA-mGBP2- und GFP-mGBP2 mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs mit *T. gondii* infiziert. Toxoplasmen wurden mit dem  $\alpha$ -SAG1 Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden

auf Lokalisation und Rekrutierung zur PV am Konfokalmikroskop LSM780 untersucht (**A, C**). Mit dem an die Agarose gekoppelten  $\alpha$ -HA (**B**) bzw. mit dem  $\alpha$ -GFP (**D**) Antikörper wurde das jeweilige Fusionsprotein mit seinen Interaktionspartnern präzipitiert. Nach Waschen und Eluieren der Proteine wurden im Western Blot mit den spezifischen Antiseren (Degrandi et al., 2007) mGBP1, 3 und 5 (**B, D**) sowie mGBP7 (**B**) nachgewiesen. Die Präzipitationskontrolle erfolgte mit dem  $\alpha$ -HA Antikörper (**B**) bzw. dem  $\alpha$ -mGBP2 Antiserum (**B, D**) oder dem  $\alpha$ -GFP Antikörper (**D**). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Leervektor pWPI transduziert waren (**B**) oder nur GFP exprimierten (**D**). **B**: +: mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs transduziert mit HA-mGBP2; -: mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs transduziert mit Leervektor. **D**: +: mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs transduziert mit GFP-mGBP2; -: mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs transduziert mit GFP.

Im Western Blot konnte die molekulare Wechselwirkung zwischen HA-mGBP2 und mGBP1, 3 und 5 (Abb. 3.43 B) gezeigt werden. Die etwas größere detektierte Bande im Immunpräzipitat bei der Färbung mit dem  $\alpha$ -mGBP1 Antiserum, könnte eine Modifikation von mGBP1 darstellen. Es ist bekannt, dass mGBP1 *in vivo* nicht vollständig isoprenyliert wird (Stickney and Buss, 2000). So ist es möglich, dass die modifizierte Spezies bei einer Immunpräzipitation mit HA-mGBP2 angereicht wird. mGBP7 ist in MEFs nur schwach exprimiert (persönliche Mitteilung von Cornelia Beuter-Gunia und Abb. 3.43 B), so dass eine Aussage über eine Interaktion nicht möglich ist. Das GFP-Konstrukt wurde lediglich auf mGBP1, 3, und 5 getestet (Abb. 3.43 D). Zusätzlich konnte eine Interaktion mit mGBP1, 3 und 5 über die Präzipitation des FLAG-mGBP2 Konstrukts oder des endogenen mGBP2 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). In einzelnen Versuchen konnten sogar beide Isoformen von mGBP5 präzipitiert werden (Abb. 3.43 D und Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Yeast-2-Hybrid Vorhersagen für Interaktionen von mGBPs untereinander überein (persönliche Mitteilung von Julia Hunn, Institut für Genetik, Universität zu Köln). Zusammenfassend lässt sich belegen, dass mGBP2 sowohl Homomultimere als auch Heteromultimere mit mGBP1, 3 und 5 bildet.



## 4 Diskussion

Das murine Guanylat-bindende Protein 2 (mGBP2) und dessen Mutanten in den konservierten Motiven der GTPase-Domäne sowie der Isoprenylierungssequenz wurden in einer Reihe von Experimenten auf ihre biochemischen und immunologischen Eigenschaften in einem parasitären Infektionsmodell untersucht. In diesem Zusammenhang wurden auch die einzelnen Domänen von mGBP2 funktionell charakterisiert. Dabei basierte die Auswahl von Punkt- und Deletionsmutanten auf den dreidimensionalen Strukturen von hGBP1 im Komplex mit dem GTP Analog GppNHp und ohne Nukleotid. Die putative Lokalisation der ausgewählten Aminosäuren konnte anhand der Strukturmodelle von mGBP2 bestimmt werden. Für die Analyse der biochemischen Funktionen wurden die GTPase- und Isoprenylierungsmutanten zunächst heterolog in *E. coli* exprimiert, die rekombinanten Proteine gereinigt und die Nukleotidbindung, die GTP-Hydrolyse sowie die nukleotidabhängige Multimerisierung untersucht. Dabei konnte der Mechanismus der konsekutiven 2-Schritte-Katalyse von GTP zu GMP analysiert, die Nukleotidaffinitäten bestimmt und der Multimerisierungsstatus von mGBP2 und dessen Mutanten geklärt werden. Die Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften des WT und definierter Mutanten von mGBP2 bildet die Grundlage zur Interpretation der zellbiologischen Experimente und damit zum Verständnis der Funktionsweise der Guanylat-bindenden Proteine allgemein. Die Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Lokalisation von mGBP2 in vesikulären Strukturen ein proteinintrinsischer Prozess ist, der abhängig von der Nukleotidbindung und der darauffolgenden Selbstassemblierung erfolgt, wobei die Isoprenylierung die Voraussetzung für die Membranassoziation darstellt. Im Gegensatz dazu bedarf die Rekrutierung zur parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM) des avirulenten Typ II *T. gondii* Stammes (ME49) weiterer IFN- $\gamma$  induzierbarer Faktoren, die möglicherweise mit mGBP2 interagieren und an dessen Transport zur PV beteiligt sind oder alternativ Konformationsänderungen induzieren, die das Protein aktivieren. Als solche Interaktionspartner kommen andere mGBPs wie mGBP1, 3 und 5 in Frage, mit denen für mGBP2 eine direkte Wechselwirkung nachgewiesen werden konnte. Studien mit Trunktionsmutanten von mGBP2 zeigen, dass die C-terminale Effektor (E)-Domäne das Zielmotiv für die Assoziation an der PVM des Parasiten enthält, welches im Zuge der IFN- $\gamma$  abhängigen Aktivierung demaskiert werden könnte, dabei erhöht die GTPase-Aktivität von mGBP2 die Effizienz der Rekrutierung in den ersten Stunden der Infektion.

Der zelluläre Phänotyp von mGBP2 defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) ist durch eine stärkere Proliferation von *T. gondii* im Vergleich zu WT Zellen charakterisiert. Zusammenfassend belegt diese Arbeit eine Rolle für mGBP2 bei der zellautonomen Abwehr gegen den intrazellulären Parasiten *T. gondii*.

## 4.1 Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften von mGBP2

### 4.1.1 mGBP2 bindet die Guaninnukleotide mit unterschiedlichen Affinitäten

Drei der klassischen Guanin-Bindemotive sind in den GBPs konserviert (Praefcke et al., 1999; Prakash et al., 2000b). Das vierte RD Motiv ist für die Guaninbasenerkennung verantwortlich (Praefcke et al., 1999). Aufgrund der Sequenzhomologie stellt mGBP2 das nächstverwandte Ortholog von hGBP1 dar (Kravets et al., 2012). Nichtsdestotrotz weisen die beiden Proteine deutliche biochemische Unterschiede auf. Die Fluoreszenztitrationen mit mant-Nukleotiden zeigen, dass die Dissoziationskonstanten für die untersuchten Guaninnukleotide im Bereich von 0,5  $\mu\text{M}$  bis 14,5  $\mu\text{M}$  liegen. Aufgrund der sofortigen Hydrolyse durch das mGBP2 Protein konnte mGTP in Titrationsexperimenten nicht eingesetzt werden. Die Stärke der Interaktion nimmt dabei von mant-GTP $\gamma$ S und mant-GDP über mant-GppNHp (s. Anhang Abb. A, Tab. A; mant-GppNHp bindet möglicherweise wegen seiner langsameren Assoziation schlechter an mGBP2 als mant-GTP $\gamma$ S (Praefcke et al., 2004)) zu mant-GMP ab. Die  $K_D$ -Werte für mant-GTP $\gamma$ S und mant-GDP sind praktisch identisch. Die Bindungskonstanten für mant-GDP und mant-GppNHp sind konform mit denen von hGBP1 (Praefcke et al., 2004). Die Affinität von mGBP2 zu mant-GMP ist allerdings um eine Ordnungsgröße schwächer, wohingegen alle drei mant-Nukleotide von hGBP1 mit fast identischen Affinitäten gebunden werden (Kunzelmann et al., 2005) und die mant-GMP-Affinität sogar etwas höher ist als für mant-GppNHp (Praefcke et al., 2004). Für ein anderes humanes Ortholog, hGBP5, konnte hingegen keinerlei GMP-Bindung beobachtet werden (Wehner and Herrmann, 2010). Ras Proteine wirken als molekulare Schalter über distinkte Konformationen in Abhängigkeit von ihrem GTP- und GDP-gebundenem Zustand (Vetter and Wittinghofer, 2001). Sie weisen stark erniedrigte GMP-Affinitäten auf (153  $\mu\text{M}$ ). Es wird vermutet, dass diese schwache GMP-Bindung zur Stabilisierung der p21Ras Proteine gegen eine spontane Denaturierung, verglichen mit dem nukleotidfreien Zustand beiträgt (John et al., 1990).

Die gemessenen Affinitäten von GTP-Analoga bei mGBP2 sind deutlich geringer als bei Ras Proteinen ( $K_D$ -Werte im pikomolaren Bereich (John et al., 1990)). Dies könnte ein Indiz für einen unterschiedlichen Interaktionsmodus zwischen Protein und Nukleotid darstellen. Die Unterschiede in Affinitäten könnten darin begründet sein, dass im Gegensatz zu den Ras-ähnlichen und  $G\alpha$  GTP-bindenden Proteinen mGBP2, vergleichbar zu hGBP1 (Prakash et al., 2000a), stabil in Abwesenheit von Nukleotid ist (Praefcke et al., 2004) und nur sehr langsam aggregiert, was mit der teilweisen Abschirmung des aktiven Zentrums vom Außenmedium durch eine Polypeptidkette zusammenhängen könnte (Dissertation G. Praefcke, 2001).

Die p47 GTPase Irga6 bindet GTP und GDP ebenfalls mit Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich, wobei jedoch die Affinität zu GDP mindestens 10-fach höher ist als zu GTP (Uthaiyah et al., 2003). Interessanterweise bindet Irga6 mant-GppNHp 25-mal schwächer als mant-GTP $\gamma$ S. Das bedeutet, dass die beiden GTP-Analoga sich nicht für alle GTPase-Typen als äquivalent erweisen. Die Bindungskonstanten der IRGs für GMP sind bisher nicht beschrieben. Andere Mitglieder der Dynamin-Familie wie Dynamin I und MxA binden mant-GppNHp mit ähnlichen Gleichgewichtskonstanten wie mGBP2, ihre Affinität zu mant-GDP ist jedoch deutlich schwächer als zum GTP-Analogen (Shpetner and Vallee, 1992; Richter et al., 1995; Binns et al., 1999; Binns et al., 2000). Die Fähigkeit zur affinen GMP-Bindung durch GBPs ist einzigartig und unterscheidet diese Familie von anderen GTPasen. Die physiologische Bedeutung dieses Phänomens bleibt jedoch bislang ungeklärt.

Die Nukleotidbindung durch mGBP2 ist abhängig von der Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ , das vermutlich ähnlich wie bei den Ras Proteinen durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatgruppen des Nukleotids, sowie durch die P-Schleife und die Switch-Regionen des Proteins koordiniert wird (Abdullah et al., 2009; Vopel et al., 2010; Wehner et al., 2012). Der Nukleotidbindungsprozess von mGBP2 ist ein Ein-Schritt-Mechanismus (Kravets et al., 2012), ähnlich wie bei hGBP1 und unterscheidet sich dadurch von den Dynaminen (Binns et al., 2000).

Die gemessenen Gleichgewichtskonstanten der Nukleotiddissoziation erlauben Rückschlüsse auf den Nukleotidbindungsstatus von mGBP2 unter physiologischen Bedingungen. In der Zelle sollte mGBP2 an alle drei Nukleotide gebunden vorliegen, da ihre zelluläre Konzentrationen über den Bindungs- $K_D$ -Werten von mGBP2 liegen (John et al., 1990; Praefcke et al., 2004). Da jedoch GTP mit intrazellulären Konzentrationen

von 50  $\mu\text{M}$  bis 300  $\mu\text{M}$  (John et al., 1990; Praefcke et al., 2004) dominiert, sollte es bevorzugt von mGBP2 gebunden werden. Die p47 GTPase Irgm3 liegt in der Zelle zu 90-95% GTP gebunden vor. Die Bindungsaffinität zu GTP *in vivo* ist unabhängig von der IFN- $\gamma$  Stimulation. Das Zytokin kontrolliert demnach die Synthese von Irgm3, jedoch nicht die biochemische Aktivität des Proteins (Taylor et al., 1997). Ein Vergleich von Bindungskonstanten ist in Tab. 4.1 gezeigt.

**Tabelle 4.1: Vergleich der Nukleotidbindung von Proteinen der Dynamin-Familie.**

Alle Konstanten sind in  $\mu\text{M}$  angegeben. Die Werte stammen aus folgenden Veröffentlichungen: hGBP1 aus (Praefcke et al., 2004; Kunzelmann et al., 2005); MxA aus (Richter *et al.*, 1995); Dynamin I/II aus (Shpetner and Vallee, 1992; Binns et al., 1999; Binns et al., 2000); Irga6 (Uthaiyah et al., 2003). m: mant. -: nicht gemessen.

	$K_D$ mGTP $\gamma$ S	$K_D$ mGppNHp	$K_D$ mGDP	$K_D$ GTP $\gamma$ S	$K_D$ mGMP
<b>mGBP2</b>	0,45	2,35	0,54	-	14,4
<b>hGBP1</b>	-	1-1,4	1,8-3,6	-	0,15-0,53
<b>MxA</b>	-	0,54-0,75	20	1,7	-
<b>Dynamin I/II</b>	-	0,2-1	20	-	-
<b>Irga6</b>	5,2	130	0,64	8	-

#### 4.1.2 Die GTP-Hydrolyse von mGBP2 ist kooperativ

Magnesiumionen sind wie bei den anderen GTP-bindenden Proteinen ein essentieller Ko-Faktor für die GTPase-Reaktion. Die Hydrolysekinetik für das WT mGBP2 bei 37°C zeigt, dass die spezifische Aktivität mit zunehmender Proteinkonzentration steigt und einen Maximalwert von 102  $\text{min}^{-1}$  erreicht. Für die Hydrolysereaktion wurde dabei keine Anlaufphase beobachtet. Diese Aktivität übersteigt die von hGBP1 mit 80-85  $\text{min}^{-1}$  (Praefcke et al., 1999; Fres et al., 2010). Selbst der kleinste gemessene Wert der Aktivität bei 0,015  $\mu\text{M}$  Protein ist mit 27  $\text{min}^{-1}$  um Größenordnungen höher, als die Hydrolysegeschwindigkeit von Ras mit 0,001-0,028  $\text{min}^{-1}$  und liegt auch oberhalb der von G $\alpha$ -Proteinen mit etwa 5  $\text{min}^{-1}$ . Der Aktivitätswert für 0,05  $\mu\text{M}$  Protein ist doppelt so hoch wie bei hGBP1 (Dissertation G. Praefcke, 2001). Für die effiziente Hydrolyse sind einige Voraussetzungen wie die korrekte Positionierung des angreifenden Wassermoleküls zum  $\gamma$ -Phosphat, die Neutralisierung der während des Übergangszustandes entstehenden negativen Ladung und die Stabilisierung der flexiblen Switch Regionen im katalytischen Zentrum erforderlich (Bourne et al., 1991; Maegley et



al., 1996). Diese Konditionen werden entweder durch eine Interaktion mit GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) (Scheffzek et al., 1998) oder durch eine Dimerisierung erreicht (Gasper et al., 2009). Die GTP-Hydrolyserate von Ras wird mit Hilfe von GAP Proteinen bis zu 1000-fach erhöht (Scheffzek et al., 1997) und erreicht unter diesen Stimulationsbedingungen mit mGBP2 und hGBP1 vergleichbare Aktivitäten. Die Voraussetzung für hohe GTP-Umsatzraten ist die schnelle Dissoziation der Produkte der enzymatischen Reaktion. Die schnellere GMP-Dissoziation von mGBP2 könnte die etwas höhere Hydrolyserate verglichen mit hGBP1 erklären. Die hohe intrinsische GTPase-Aktivität von mGBP2 lässt den Schluss zu, dass, im Gegensatz zu den Ras Proteinen, mGBP2, wie auch hGBP1, keiner zusätzlichen Faktoren bedarf, und dass der Anstieg der Aktivität mit kooperativer Wechselwirkung der Proteinmoleküle während der Hydrolyse erklärt werden kann. Wird diesem kooperativen Verhalten ein Modell der Proteindimerisierung zugrundegelegt, so lässt sich daraus die Dimerdissoziationskonstante für mGBP2 herleiten, die bei 0,03  $\mu\text{M}$  liegt. Die Dimer Affinität von mGBP2 Molekülen ist damit zehnmal stärker als die von hGBP1 (0,28  $\mu\text{M}$ , Praefcke et al., 2004), wodurch sich höhere Aktivitätswerte bei geringen Proteinkonzentrationen erklären lassen. In diesem Zusammenhang könnte angenommen werden, dass die 400-fach höhere Dissoziationskonstante von hGBP5 der Grund für das schwache kooperative Verhalten des Proteins ist, das in einer relativ zu mGBP2 erniedrigten GTPase-Aktivität ( $14 \text{ min}^{-1}$ ) resultiert (Wehner and Herrmann, 2010).

In der inaktiven Tetramerform von Dynamin ist die intrinsische spezifische Aktivität der GTP-Hydrolyse 50-fach geringer als bei mGBP2 und liegt bei etwa  $2 \text{ min}^{-1}$  (Sever et al., 1999; Binns et al., 1999; Binns et al., 2000). Durch die Bindung an negativ geladene Membranlipide und Selbstassemblierung in helikalen Strukturen wird die GTPase-Aktivität von Dynamin stimuliert und erreicht einen Wert von bis zu  $120 \text{ min}^{-1}$  (Tuma et al., 1993; Tuma and Collins, 1994; Tuma and Collins, 1995; Warnock et al., 1996), welcher der maximalen Aktivität von mGBP2 sehr ähnlich ist. Bindung an Membranen und Interaktionspartner wie Grb2 führt zu einer weiteren Steigerung der GTPase-Aktivität von Dynamin bis auf  $350 \text{ min}^{-1}$  (Barylko et al., 1998). Die GTP-Hydrolyse ist essentiell für die Dynamin-katalysierte Membranabschnürung *in vivo* und *in vitro*. Die basale Aktivität von Dynamin ist erforderlich für die frühen endozytotischen Prozesse, die stimulierte Aktivität durch Assemblierung bedingt die späte Phase an der Membran (Mettlen et al., 2009). Auf diese Weise spielt Dynamin eine doppelte Rolle in Clathrin-vermittelter Endozytose.

Die spezifische Aktivität von MxA wurde abhängig von der Art der Proteinisolierung zwischen  $27 \text{ min}^{-1}$  und  $70 \text{ min}^{-1}$  gemessen (Horisberger, 1992; Richter et al., 1995; Marks et al., 2001). Die MxA GTPase-Aktivität wird durch die E-Domäne stimuliert (Schwemmle et al., 1995). Sie formen ähnlich wie die Dynamine nukleotidabhängig geordnete Ringe durch Oligomerisierung an viralen Nukleokapsiden und binden an negativ geladene Membranen, wodurch es zur Kooperativität und Steigerung der GTPase-Aktivität kommt (Accola et al., 2002; Kochs et al., 2005). Ebenfalls wurde die Stimulation der Aktivität von MxA durch Antikörper berichtet (Horisberger, 1992). Die kooperative Hydrolyse von Atlastin 1 verursacht starke Konformationsänderungen, die die homotypische Fusion von ER-Membranen vermitteln (Bian et al., 2011). Die Hydrolyse des p47 IRG Irga6 ist ebenfalls kooperativ und die spezifische Aktivität steigt mit zunehmender Proteinkonzentration. Sie ist aber deutlich langsamer als bei den anderen großen GTP-bindenden Proteinen und erreicht maximal  $5,2 \text{ min}^{-1}$ , wobei die Kooperativität erst bei höheren Proteinkonzentrationen auftritt (Uthaiyah et al., 2003). Weitere Studien zeigen, dass auch Irgm3 und Irgb6 p47 GTPasen GTP hydrolysieren können (Taylor et al., 1997; Uthaiyah et al., 2003). Auch andere GTPasen wie Toc34 in Chloroplasten, SRP oder MnmE steigern ihre GTPase-Aktivität über die Dimerisierung von G-Domänen (Sun et al., 2002; Egea et al., 2004; Scrima and Wittinghofer, 2006), dabei erfüllen die G-Domänen die Funktion der GAP Proteine für einander.

Die Tabelle 4.2 stellt die Aktivitätswerte und die Dimerkonstanten verschiedener GTPasen vergleichend dar.

**Tabelle 4.2: Vergleich der GTP-Hydrolyse von Proteinen der Dynamamin-Familie.**

Die spezifischen Aktivitäten sind in  $\text{min}^{-1}$  und die Proteindimerkonstanten in  $\mu\text{M}$  angegeben. Die Werte stammen aus folgenden Veröffentlichungen: hGBP1 aus (Praefcke et al., 2004); MxA aus (Richter *et al.*, 1995), Dynamamin I/II aus (Shpetner and Vallee, 1992; Binns et al., 1999; Binns et al., 2000); Irga6 (Uthaiyah et al., 2003); Ras-GAP (Scheffzek et al., 1997). -: nicht gemessen.

	Max. spez. Aktivität ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_D$ Dimer ( $\mu\text{M}$ )
<b>mGBP2</b>	102	0,03
<b>hGBP1</b>	85	0,28
<b>MxA</b>	27	-
<b>Dynamamin I/II</b>	120	-
<b>Irga6</b>	5,2	-
<b>Ras-GAP</b>	280	-

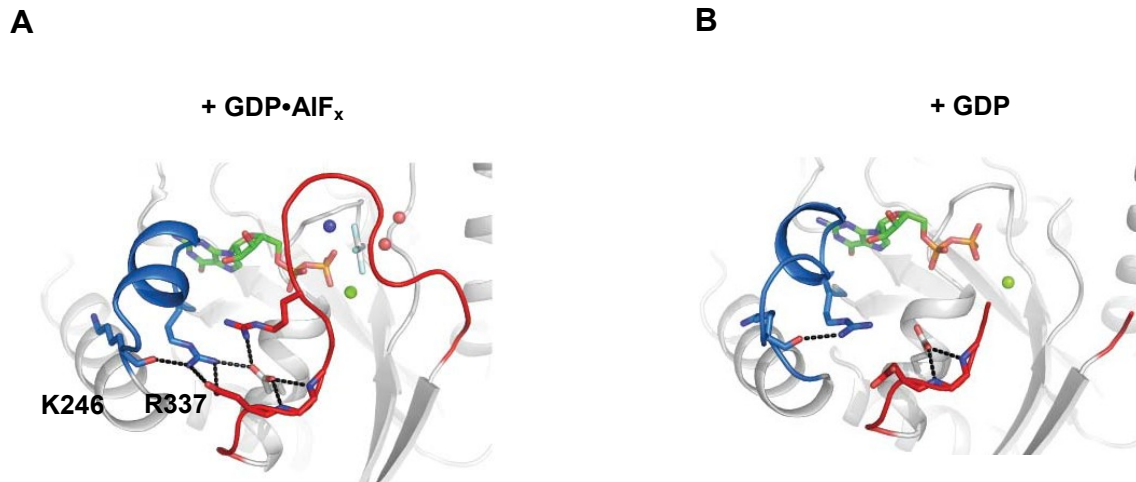
Kleine GTPasen aber auch große GTP-bindende Proteine wie Dynamine, Mx und IRGs hydrolysieren GTP zu GDP, aber nicht zu GMP (Uthaiyah et al., 2003). Einzigartig an GBPs ist ihre Fähigkeit GTP sowohl zu GDP als auch zu GMP in zwei aufeinanderfolgenden Schritten zu hydrolysieren (Schwemmle and Staeheli, 1994). Für mGBP2 ist das Hauptprodukt der GTP-Hydrolyse des rekombinanten, nicht modifizierten Proteins bei 37°C GMP mit 74% des Produktanteils. Ähnliche Produktverhältnisse wurden auch für hGBP1 bestimmt (85%, Praefcke et al., 2004; Fres et al., 2010), wohingegen hGBP2 hauptsächlich GDP produziert (Neun et al., 1996). Interessanterweise katalysiert hGBP5 nur den ersten Hydrolyseschritt und erzeugt gar kein GMP (Wehner and Herrmann, 2010). Die Kontinuität der Zwei-Schritte Katalyse wurde für mGBP2 in dieser Arbeit erstmals gezeigt, denn GDP eignet sich, trotz der vergleichbaren Bindungsaffinitäten zu GTP-Analoga, nicht als Substrat für die kooperative Hydrolyse. hGBP1 kann ähnlich wie mGBP2 GDP nicht oder nur sehr ineffizient hydrolysieren (die GDPase-Aktivität von hGBP1 hat eine katalytische Konstante von  $0,036 \text{ min}^{-1}$  bei 25°C (Schwemmle and Staeheli, 1994; Vopel et al., 2010), weil das GDP-gebundene hGBP1 kein Dimer formen kann, das essentiell für die Stimulation der Aktivität ist (Prakash et al., 2000a). Die G-Domäne von hGBP1 alleine ist jedoch in der Lage GDP zu GMP zu hydrolysieren (Vopel et al., 2010).

Für den Hydrolysemechanismus von hGBP1 wird angenommen, dass die Flexibilität der GTP-Bindungstasche für die Konversion von GTP zu GMP verantwortlich ist, und dass die konsekutive GDP-Hydrolyse nach dem gleichen Reaktionsmechanismus innerhalb des aktiven Zentrums erfolgt wie die GTP-Hydrolyse (Kunzelmann et al., 2005; Kunzelmann et al., 2006; Ghosh et al., 2006).

Im katalytischen Mechanismus von Ras und von  $G\alpha$  Proteinen ist ein Glutamin involviert (Gln 61 in Ras), das den Übergangszustand stabilisiert und selbst durch die GAP-Katalyse stabilisiert wird (Scheffzek et al., 1998). Eine dem Gln 61 analoge hydrophobe Aminosäure wurde auch in Dynaminen und Mx Proteinen entdeckt. Der chemische Mechanismus der Katalyse von GBP unterscheidet sich jedoch von dem der Ras Proteine. Die geladenen Aminosäuren im Switch II Motiv, die in GBPs konserviert sind, könnten hier eine katalytische Rolle spielen (Prakash et al., 2000a).

Bei den Dynaminen wird während der GTP-Bindung und G-Domänendimerisierung eine spezifische Schleife zum aktiven Zentrum rekrutiert. Das darin enthaltene R237 kontaktiert dabei die Switch I Region und unterstützt damit die Ausbildung eines starken

Wasserstoffbrückennetzwerkes. Diese Interaktionen finden während der GDP-Bindung nicht statt, daher kann Dynamin GDP nicht als Substrat verwenden (Chappie et al., 2010, Abb. 4,1). Bei den GBPs fehlt diese Schleife allerdings, der Mechanismus der Hydrolyse wird also ein anderer sein.



**Abb. 4.1: Konformationsänderungen des aktiven Zentrums, die durch die G-Domänen Dimerisierung und GTP-Hydrolyse von Dynamin induziert werden.**

Konformationsänderungen der Dynamin-spezifischen Schleife (blau) werden über ein dichtes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt, das die Switch I Region involviert (rot), GDP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> stabilisiertes Dimer (A) und, GDP-gebundenes *Dictyostelium* Dynamin A (B). Aus (Chappie et al., 2010).

Es wurde gezeigt, dass der Bruch zwischen den  $\alpha_{12/13}$  Helices und der  $\alpha_{4'}$  Helix in der GTPase-Domäne von hGBP1 zu einem starken Anstieg der GMP Produktion gegenüber dem WT führt, wobei die GTPase-Aktivität nur geringfügig steigt (Vopel et al., 2010). Bemerkenswert ist jedoch, dass bei dieser Mutante die GDPase-Aktivität auf das 20-fache erhöht wird, wodurch der GDPase-Aktivitätswert der G-Domäne von hGBP1 fast erreicht wird. Weiterhin ist für das hGBP1 die Übertragung der Konformationsänderung durch die GTP-Hydrolyse von der N-terminalen zur C-terminalen Domäne beschrieben (Vopel et al., 2009). Wird diese relative Flexibilität der Domänen durch eine artifiziell eingeführte Disulfidbrücke aufgehoben, damit das Protein also in seiner Konformation fixiert, ändert sich die GTP-Hydrolyse Aktivität von hGBP1 nicht, jedoch die GDP-Hydrolyse, die direkt im Anschluss an die GTP-Spaltung anknüpft. Sie ist dann 10-fach reduziert wie auch die Produktion von GMP, die dann nur noch 4% ausmacht. Die GTPase- und GDPase-Aktivitäten von isolierten G-, GM- und GE-Domänen von mGBP2 gilt es noch zu untersuchen. Die hierfür erforderlichen Konstrukte wurden bereits kloniert und die rekombinanten Proteine erfolgreich exprimiert. Aus den von hGBP1 existierenden Daten lässt sich für das mGBP2 vermuten, dass die helikale Domäne einen starken regulierenden Effekt auf die Nukleotidhydrolyse ausüben könnte. Bei Dynamin ist die GTPase

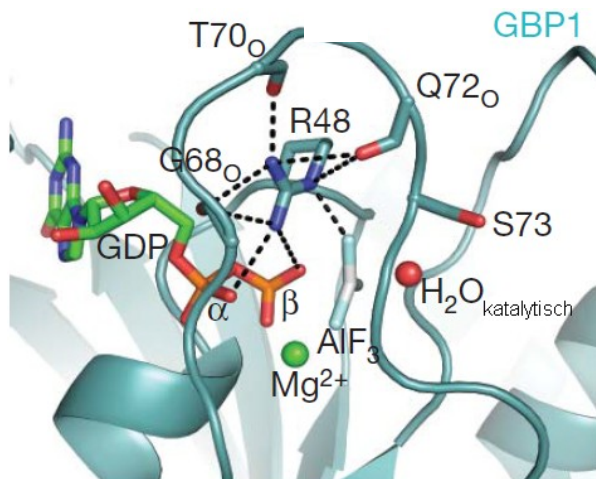
stimulierende Wirkung der E-Domäne, die durch zwei positiv geladene Aminosäuren vermittelt wird, bereits bekannt (Sever et al., 1999; Sever et al., 2000; Chappie et al., 2010). Für mGBP2 lässt sich spekulieren, dass die  $\alpha$ 12/13 Helices die GDPase Aktivität von extern zugefügtem GDP inhibieren. Die Aufhebung der Regulation der GTPase-Domäne durch die helikale Domäne könnte die externe GDP-Hydrolyse ermöglichen und die interne verstärken. Der vorgeschlagene Mechanismus für hGBP1 ist eine Umstrukturierung des Proteins, die im Zuge der GTP-Hydrolyse erfolgt und durch die  $\alpha$ 4' Helix vermittelt wird (Vopel et al., 2010). Das bedeutet, dass die GTP- und GDP-Hydrolyse zur Generierung bestimmter mechanischer Kräfte verwendet werden, die strukturelle Veränderungen initiieren, dabei könnte der zweite Hydrolyseschritt dafür sogar noch wichtiger sein. Abdullah et al. konnten zeigen, dass die helikale Domäne für die Stimulation der GTP-Hydrolyse verantwortlich ist und insbesondere für die GMP-Produktion (Abdullah et al., 2009). Ferner postulieren sie, dass die Aktivität besonders durch die Abspaltung der zweiten Phosphatgruppe durch allosterische Interaktionen einer kleinen intermediären  $\alpha$ -Helix, die als GAP fungiert, stimuliert wird. Das  $_{103}\text{DXEKGD}_{108}$  Motiv von hGBP1 stellt dabei die für die Katalyse erforderlichen Aminosäuren zur Verfügung (Abdullah et al., 2009). Die Fusion der GAP- mit der katalytischen Domäne gewährleistet den GBPs die höhere Stabilität der Proteine und die Unabhängigkeit von externen GAP Proteinen zur Stimulation der GTPase-Aktivität und der Oligomerisierung. Die Besonderheit dieser Proteinklasse gibt einen Hinweis darauf, dass die Funktion der GBPs nicht über den „on-und-off“-Schalter-Modus reguliert wird, wie das für die kanonischen GTPasen bekannt ist, sondern wohl eher in einer graduellen Art und Weise kontrolliert wird (z. B. über niedrige und hohe Aktivität in Abhängigkeit vom nukleotidabhängigen Oligomerisierungsstatus). Diese Feinregulation könnte möglicherweise erklären, wie die großen GTPasen evolutionär entstanden sind und eine große Bandbreite von zellulären Funktionen, wie die anti-mikrobielle Aktivität, Regulation der Membrandynamik und Signalkaskaden übernehmen können (Dissertation G. Praefcke, 2001). Wenn die GBPs eine Funktion als molekulare Schalter oder IFN- $\gamma$  induzierbare Effektormoleküle ausüben, bietet die Bildung eines Dimers zusätzliche Regulationsmöglichkeiten. Falls die GBPs als mechanochemische Enzyme fungieren, kann aus der Hydrolyse von GTP zu GMP mehr Energie gewonnen werden als aus einem einzigen Hydrolyseschritt (Dissertation G. Praefcke, 2001) .

### 4.1.3 mGBP2 multimerisiert nukleotidabhängig

Zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität von mGBP2 wurde das gereinigte Protein nukleotidfrei und in seiner monomeren Form eingesetzt. Das beobachtete kooperative Verhalten bei zunehmender Proteinkonzentration gab einen Hinweis auf intermolekulare Interaktionen der Proteinmoleküle, die mit der GTP-Bindung im Zusammenhang stehen. Darum wurde der Grad der Multimerisierung von mGBP2 in allen Nukleotidbindezuständen bestimmt. Um eine vollständige Sättigung aller Proteinmoleküle zu gewährleisten, wurde in größenausschlusschromatographischen Experimenten mindestens die 3,5-fache Konzentration des jeweiligen Nukleotids, basierend auf der, zuvor bestimmten, Dissoziationskonstanten, eingesetzt. Die Analyse der Elutionsprofile von mGBP2 zeigt, dass das Protein im nukleotidfreien Zustand und in Gegenwart von GMP, ähnlich wie hGBP1 (Praefcke et al., 2004), als Monomer vorliegt. Die hGBP5a/b Spleißvariante (Aminosäuren 1-586) ist jedoch ein konstitutives Dimer, welches über die Assemblierung der C-terminalen helikalen Domänen zustande kommt (Wehner and Herrmann, 2010; Shenoy et al., 2012). hGBP5 bleibt auch nach der Bindung von GMP und GDP ein Dimer. Im Gegensatz zu mGBP2 ist Dynamin im nukleotidfreien Zustand ein Homotetramer. Dieses Tetramer stellt die inaktive Grundeinheit dar (Warnock et al., 1996; Muhlberg et al., 1997; Hinshaw, 2000).

Die Bindung von GDP oder GTP Analoga GTP $\gamma$ S und GppNHp führt bei mGBP2 zur Bildung von Dimeren. Von Interesse ist auch, dass Atlastin 1 in Gegenwart von GDP oder GTP $\gamma$ S dimerisiert (Bian et al., 2011). Bezugnehmend auf das Multimerisierungsverhalten von hGBP1, fällt die Dimerisierung von mGBP2 in Gegenwart von GDP besonders auf, wohingegen sein humanes Ortholog im GDP-gebundenen Zustand ein Monomer bleibt (Praefcke et al., 2004). Dies könnte bedeuten, dass die Assoziation der Dimere von mGBP2 schneller als die Dissoziation ist. Nichtsdestotrotz besitzt dieses Dimer keine kooperative GDPase-Aktivität, kann also möglicherweise das  $\beta$ -Phosphat nicht an die Stelle des  $\gamma$ -Phosphats positionieren, wie das für das hGBP1 vorhergesagt wird (Kunzelmann et al., 2005). Eine andere Möglichkeit ist die Erfordernis der Energie aus der GTP-Hydrolyse für die mechanische Umstrukturierung des aktiven Zentrums. Die Dimerassemblierung von hGBP1 nach Bindung von GTP-Analoga erfolgt über die Interaktionsstellen in der GTPase-Domäne (Vopel et al., 2010). Bei hGBP5 führt die Bindung von GppNHp zur Dimerisierung der Dimere in einer von der GTPase-Domäne abhängigen Art und Weise, also zur Ausbildung von Tetrameren (Wehner and Herrmann, 2010).

In der Gegenwart von GDP und  $\text{AlF}_x$  bildet mGBP2 in Analogie zu hGBP1 tetramere Komplexe, die für die Beschleunigung der Katalyse verantwortlich sind (Kunzelmann et al., 2005; Vopel et al., 2010; Wehner and Herrmann, 2010). Das Protein wird hierbei in seinem GTP-Hydrolyse-Übergangszustand eingefangen, wie das für andere GTP-bindende Proteine bereits gezeigt wurde (Bigay et al., 1985). Dabei ahmt das von drei oder vier Fluoridionen umgebene Aluminium den planaren Komplex des von drei Sauerstoffen umgebenen Phosphoratoms nach (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2:** Die katalytische Maschinerie, die bei hGBP1 GTP-Hydrolyse involviert ist.

Gestrichelte Linien markieren Wasserstoffbrücken. Bindung von  $\text{AlF}_3$  ahmt den Übergangszustand von hGBP1 nach, (PDB Eintrag 2B92, Ghosh et al., 2006). Aus (Chappie et al., 2010).

Bei Ras und Rho GTPasen wird dieser Zustand durch GAPs und bei  $\text{G}\alpha$ -Proteinen durch die proteininterne Argininseitenkette stabilisiert, die auf diese Weise die Hydrolyse stark beschleunigen. Ein GTP-gebundenes Dimer würde folglich der grundlegenden katalytischen Einheit für mGBP2 entsprechen, die durch weitere intermolekulare Wechselwirkungen aktiviert wird. Studien mit trunkierten Mutanten von hGBP1 halfen bei der Identifizierung einer hydrophoben Helix ( $\alpha 6$ ) in der Verbindungsregion zwischen der G-Domäne und den C-terminalen Domänen für die eine kritische Rolle im Dimerisierungsprozess und der Regulierung der GTPase-Aktivität vorhergesagt wird (Abdullah et al., 2010). Die entsprechende Sequenz bei mGBP2 ist mit hGBP1 zu 80% homolog (Abb. 4.3).

hGBP1	(291)	PRL	ESLV	LT	FV	NAIS	(305)
mGBP2	(289)	PRL	KSLV	Q	FV	GAIS	(303)

**Abb. 4.3:** Sequenzalignment der  $\alpha 6$ -Helix von hGBP1 und der putativen  $\alpha 6$ -Helix von mGBP2.

Im Kontext der Oligomerisierung ist die R227E/K228E Mutante von hGBP1 besonders interessant. Sie hebt den Kontakt zwischen der GTPase-Domäne und den C-terminalen  $\alpha 12/13$  Helices des Proteins auf und bildet Tetramere bereits in Gegenwart von GppNHp,

wobei die Bindung von GDP·AlF<sub>x</sub> nicht zur Formung höhermolekularer Strukturen führt (Vopel et al., 2010). Durch diese Mutation entsteht eine Flexibilität der Konformation von hGBP1, wodurch die C-terminale Interaktionsfläche (E556; E563, E568, E575), deren Exposition im WT Protein unter der Kontrolle der nukleotidabhängigen Multimerisierung und der GTPase-Aktivität steht, demaskiert wird und in einem konstitutiven Dimer resultiert, das unabhängig von der Dimerisierung der G-Domänen entsteht. So ist anzunehmen, dass das WT Protein von mGBP2 zunächst GTP-abhängig über die G-Domäne dimerisiert und nachfolgend über die durch Hydrolyse entstehende weitere Interaktionsoberfläche Tetramere bildet (Prakash et al., 2000a; Vopel et al., 2009; Vopel et al., 2010; Wehner et al., 2012). Abdullah et al., zeigen eine absolute Abhängigkeit der GMP-Bildung von der Dimerisierung und postulieren damit eine katalytische Interaktion zwischen Monomeren während des zweiten Hydrolyseschrittes (Abdullah et al., 2009; Abdullah et al., 2010).

Im Gegensatz zu mGBP2 wird der Dimerstatus von hGBP5a/b durch die Bindung von GDP·AlF<sub>x</sub> nicht verändert (Wehner and Herrmann, 2010). Es wird postuliert, dass mechanistisch, anders als bei mGBP2 angenommen, die Tetramerisierung bei hGBP5 über die Zusammenlagerung der GTPase-Domänen konstitutiver C-terminaler Dimere nach Nukleotidbindung, ähnlich wie bei den Mx Proteinen (Haller et al., 2010), erfolgt, und dass die Hydrolyse, wiederum anders als bei mGBP2, zu einer Dissoziation des Komplexes führt (Wehner and Herrmann, 2010), wie das für Oligomere von Dynamin beschrieben wurde (Ramachandran and Schmid, 2008). Ähnlich zu hGBP5 bleibt das GBP verwandte Protein Atlastin 1 ein Dimer in Anwesenheit von GDP·AlF<sub>x</sub> (Byrnes and Sondermann, 2011). Bei Atlastin 1 stellt die Dimerisierung der G-Domänen auf gegenüberliegenden ER Membranen den ersten Schritt für die Membranfusion dar (Bian et al., 2011)

Die G-Domäne von Dynamin dimerisiert in Anwesenheit von GTP oder GDP·AlF<sub>x</sub> (Chappie et al., 2010). Im Zuge der GTP-Hydrolyse wird durch das Dimer die GTPase-Domäne aktiviert und die Konformation der flexiblen Switch Regionen stabilisiert. Daraufhin folgt die Oligomerisierung zu hochmolekularen Ringen und Spiralen, wodurch mechanochemische Kräfte erzeugt werden, die zur Membraneinschnürung führen (Herskovits et al., 1993b; Hinshaw and Schmid, 1995; Warnock et al., 1996; Muhlberg et al., 1997; Hinshaw, 2000). Aber auch ohne GTP kann die Oligomerisierung der Dynamine bei ausreichender Proteinkonzentration in Lösung und geringer Ionenstärke induziert werden. Bemerkenswert ist, dass die Oligomerisierung von Dynamin sowohl im GppNHp-



gebundenen Zustand als auch im Komplex mit GDP·AlF<sub>x</sub> stattfindet (Carr and Hinshaw, 1997; Stowell et al., 1999). Die Ringe und Spiralen unterscheiden sich jedoch in Dimension und Größe. Auch bei MxA führt die Bindung von GDP·AlF<sub>x</sub> zur Ausbildung von großen oligomeren Strukturen (Kochs et al., 2002; Haller et al., 2010). Dabei findet in Anwesenheit von Guaninnukleotiden eine Umformung von filamentösen Strukturen zu Ringen und kompakten Helices statt. Die p47 GTPase Irga6 oligomerisiert ebenfalls in Abhängigkeit von der GTP-Bindung, wodurch die GTPase-Aktivität gesteigert wird (Uthaiyah et al., 2003; Ghosh et al., 2004; Pawlowski et al., 2011). Die Fähigkeit der drei Klassen der großen IFN induzierbaren GTPasen nukleotidabhängig zu oligomerisieren könnte auf eine ähnliche Funktion im biologischen System hindeuten.

Bei hGBP1 ist die Ausbildung von Di- und Tetrameren unter physiologischen Salzbedingungen etwas schwächer (Fres et al., 2010). Die Experimente mit mGBP2 wurden in salzarmen Lösungen durchgeführt (5 mM MgCl<sub>2</sub>), so dass der Einfluss von elektrostatischen Wechselwirkungen auf das Assemblierungsverhalten von mGBP2 untersucht werden müsste, um den intrazellulären Oligomerisierungszustand des Proteins mit größerer Wahrscheinlichkeit vorhersagen zu können.

Da mGBP2 rekombinant in *E. coli* und somit ohne C-terminale Isoprenylierung exprimiert wurde, kann keine Aussage über den Einfluss von Lipiden auf die Oligomerisierung gemacht werden. Dennoch, bezugnehmend auf die zellulären Nukleotidkonzentrationen (John et al., 1990), die in dieser Arbeit bestimmten Nukleotidaffinitäten und die Hydrolyserate, kann vorhergesagt werden, dass mGBP2 unter physiologischen Bedingungen Oligomere ausbilden wird, was durch kürzlich durchgeführte homo-Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Experimente in lebenden Zellen bestätigt wurde (Kravets et al., 2012). Dabei weist die Abnahme der Anisotropie bzw. die Zunahme der Depolarisation des Fluoreszenzsignals der GFP-mGBP2-Moleküle innerhalb der vesikelartigen Strukturen auf eine Multimerisierung der Proteine hin (s. Anhang, Abb. F, Tab. B). Interessant war dabei die Beobachtung, dass die Hydrolyse-defiziente K51A Mutante von mGBP2 unter physiologischen Bedingungen keine Oligomere ausbilden kann, was anhand von leicht höheren Anisotropiewerten als beim WT Protein festgemacht werden konnte.

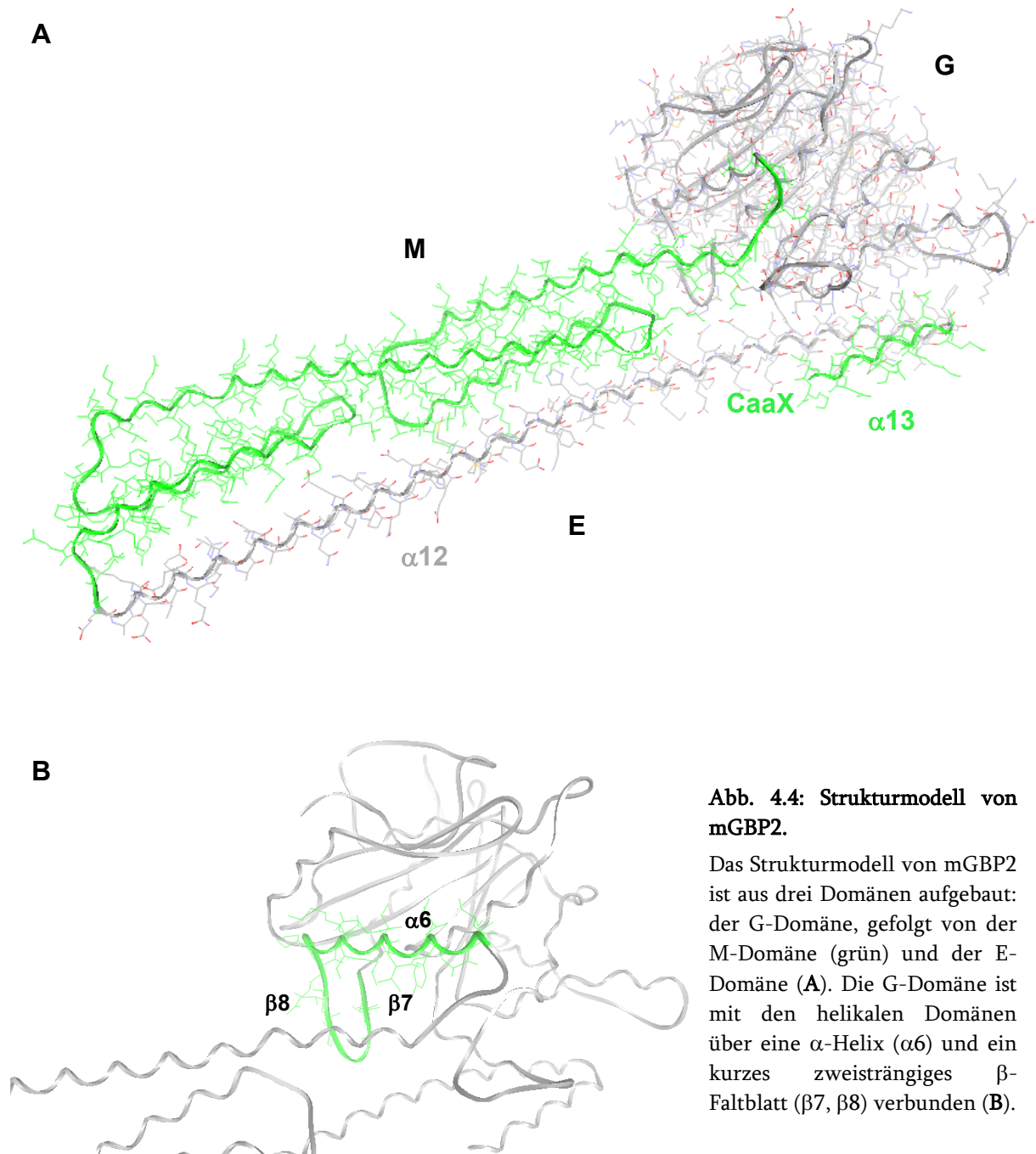
#### 4.1.4 Strukturmodell von mGBP2

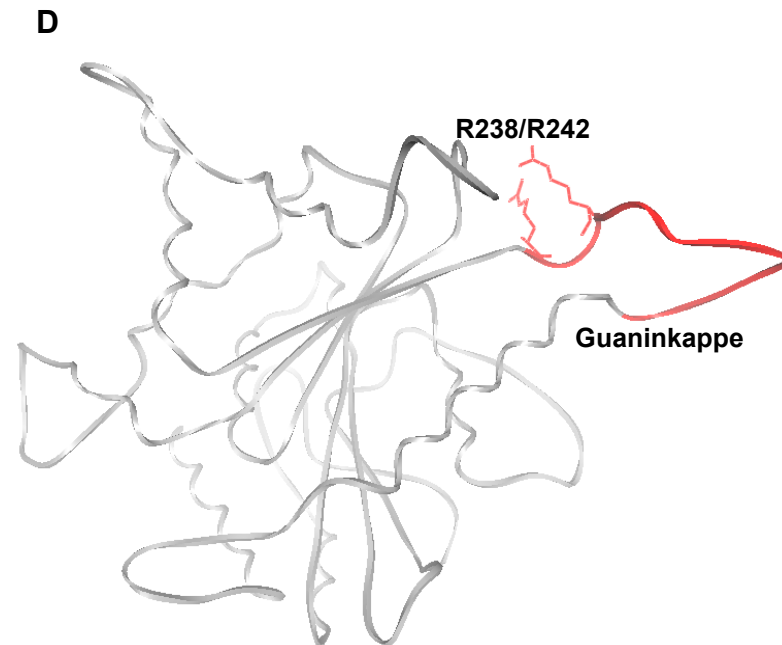
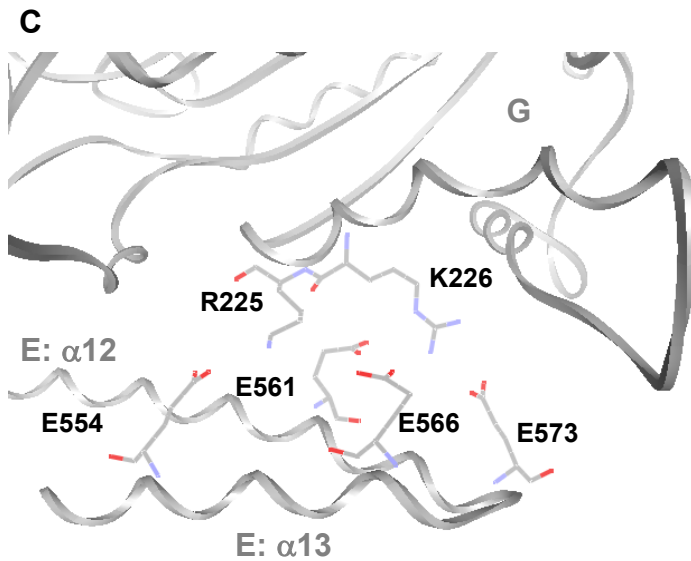
Ein Modell der Struktur von mGBP2 wurde auf der Basis der dreidimensionalen Kristallstruktur von hGBP1 (PDB Eintrag 1DG3, Prakash et al., 2000a) mit Hilfe des Programms SWISS-MODEL erstellt. Die Struktur kann in eine kompakte globuläre GTPase-Domäne (6-276) und zwei ausschließlich  $\alpha$ -helikalen Domänen aufgeteilt werden (Abb. 4.4 A). Die N-terminale GTPase-Domäne (G-Domäne) enthält insgesamt 303 Aminosäuren und ist mit den helikalen Domänen über eine kurze intermediäre Region verbunden, die eine  $\alpha$ -Helix ( $\alpha_6$ ) und ein kurzes zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta_7$ ,  $\beta_8$ ) enthält (Abb. 4.4 B). Die für GTP-bindende Proteine typische Ras-Topologie ist bei der G-Domäne von mGBP2 um einige Zusätze und Einfügungen erweitert. Die G-Domäne verfügt über die konservierten Sequenzelemente der GTP-Bindeproteine mit einigen Modifikationen. Sie besteht aus einem achtsträngigen  $\beta$ -Faltblatt mit sechs parallelen und zwei antiparallelen Strängen, die von neun Helices umgeben sind (Abb. 4.4 A, B).

Die mittlere, helikale Domäne (M-Domäne) besteht aus sieben Helices, die orthogonal zur G-Domäne angeordnet sind (Abb. 4.4 A). Sie enthält zwei dreifache Helixbündel, wobei jeweils eine Helix die beiden Bündel verbindet. Diese Domäne verleiht der Struktur ihre gestreckte Form.

Gefolgt wird die M-Domäne von einer sehr langen helikalen Domäne, die aus einer langen und einer kurzen  $\alpha$ -Helix besteht und an der M-Domäne in Richtung der G-Domäne entlang läuft (Abb. 4.4 A). Die lange Helix der C-terminalen Domäne korrespondiert mit der  $\alpha_{12}$  Helix von hGBP1, mit einer voraussichtlichen Länge von 118 Å. Basierend auf der Sequenzanalyse, weist diese Domäne eine „coiled-coil“ Struktur auf. Ihr C-terminales Ende mündet nach einer Richtungsumkehr in der kleinen  $\alpha$ -Helix, die analog zu  $\alpha_{13}$  in hGBP1 ist (Abb. 4.4 A). Die letzten acht Aminosäuren inklusive des CaaX Motivs für Isoprenylierung konnten in diesem Modell nicht aufgelöst werden.  $\alpha_{12}$  und  $\alpha_{13}$  werden in dieser Arbeit als die E-Domäne bezeichnet. Die  $\alpha_{12}$  Helix der E-Domäne hat wahrscheinlich nur wenige direkte Kontakte mit der M-Domäne (Abb. 4.4 A). An ihrem Ende kontaktiert die E-Domäne die G-Domäne, mit der sie ionische Wechselwirkungen zwischen den basischen Aminosäuren R225/K226 in der G-Domäne und den sauren Aminosäuren E554, E561, E566 und E573 der  $\alpha_{12}$  und  $\alpha_{13}$  Helices eingehen könnte (Abb. 4.4 C). Für hGBP1 wurde gezeigt, dass neben den konservierten Aminosäuren in der G4 Region eine einzigartige Guaninkappe (Aminosäuren 238-255), die aus zwei kurzen  $\alpha$ -Helices besteht und die Nukleotidbindungsstasche nach GTP-

Bindung abschließt, für die feste Substratbindung verantwortlich ist (Ghosh et al., 2006 Abb. 4.4 D). Neueste Studien belegen, dass diese Region, insbesondere die Aminosäuren R240, R244, (bei mGBP2 R238 und R242, Abb. 4.4 D) auch für die Dimerisierung und Aktivierung der GTP-Hydrolyse essentiell sind (Wehner et al., 2012).





Das elektrostatische Oberflächenpotential gibt einen Hinweis darauf, dass die  $\alpha 12$  Helix eine hydrophile und stark geladene Oberfläche der zwei helikalen Bündel maskiert, die in Folge der, durch die GTP-Hydrolyse induzierten Konformationsänderungen, präsentiert würden, wodurch eine weitere Interaktionsoberfläche entstehen könnte, die zu der beobachteten Tetramerisierung von mGBP2 führt und unter physiologischen Bedingungen als eine Andockstelle für IFN- $\gamma$  induzierbare Faktoren dient. Diese zweite Interaktionsoberfläche wurde für hGBP1 durch Mutagenese von R227 und K228 (bei mGBP2 R225 und K226, Abb. 4.4. C) und den zuvor beobachteten Konformationsänderungen in der helikalen Domäne im Hydrolyseprozess entdeckt

(Prakash et al., 2000a; Vopel et al., 2009; Vopel et al., 2010; Wehner et al., 2012). In einem Dimer kontaktieren sich voraussichtlich die beiden G-Domänen. Dieses gestreckte Kopf zu Kopf Dimer könnte die Verbindung von GTP-Bindung und Dimerisierung erklären (Prakash et al., 2000a; Ghosh et al., 2006). In der Literatur wird vorgeschlagen, dass die Wechselwirkungen zwischen der G-Domäne und den  $\alpha$ 12/13 Helices die Demaskierung der helikalen Interaktionsoberfläche über die GTPase-Aktivität kontrollieren. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen den Schluss zu, dass das WT Protein von mGBP2 zunächst GTP-abhängig über die G-Domäne dimerisiert und nachfolgend über die, durch Hydrolyse entstehende, weitere Interaktionsoberfläche Dimere von Dimeren, also Tetramere bilden kann.

## **4.2 Biochemische Analyse von Mutanten in der GTPase-Domäne und an der Isoprenylierungsstelle**

Es wurden mehrere Aminosäuren in der G-Domäne von mGBP2 mutiert, für die, basierend auf der Kristallstruktur von hGBP1 mit GppNHp (PDB Eintrag 2BC9, Ghosh et al., 2006) und dem davon abgeleiteten Modell von mGBP2 (Abb. 4.5), eine räumliche Nähe zu den Phosphatgruppen von GTP vorhergesagt werden konnte und die innerhalb der GBPs konserviert sind. In der G-Domäne fiel die Wahl auf die Aminosäuren R48 und K51 in der P-Schleife, auf E99 in der Switch II Region und auf D182 in der Bindungstasche der Guaninnukleotide. Zusätzlich wurde das Cystein im CaaX Motiv mutiert, um den Einfluss der Isoprenylierung auf die Aktivität des Proteins zu untersuchen.

### **4.2.1 Das konservierte Lysin 51 in der P-Schleife ist essentiell für alle Schritte des GTPase-Zyklus**

Alle Proteine, die eine P-Schleife enthalten, binden die  $\gamma/\beta$ -Phosphatgruppen in einer ähnlichen Art und Weise. Die Lysinseitenkette innerhalb dieses Motivs ist unter den GTP-bindenden Proteinen stark konserviert (Praefcke et al., 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die K51A Mutation starke Auswirkungen auf die Aktivität von mGBP2 hat. Die Affinitäten zu allen drei Guaninnukleotiden sind bei dieser Mutante über 100-fach erniedrigt. Unter physiologischen Bedingungen sollte das Protein jedoch

zumindest teilweise GTP-gebunden vorliegen. Eine Oligomerisierung konnte jedoch auch unter Berücksichtigung der hohen Dissoziationskonstanten für die Mutante (s. Anhang, Abb. B) nicht beobachtet werden und die GTPase-Aktivität ist vollständig aufgehoben. Das K51 scheint also für alle Schritte des GTPase-Zyklus: Nukleotidbindung, Oligomerisierung und Katalyse essentiell zu sein. Die Rolle des konservierten Lysins in der P-Schleife der Phosphatasen ist gut beschrieben (Hanson and Whiteheart, 2005). Für das p21Ras wird ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem der Protonentransfer von dem korrespondierenden Lysin (K16) auf das  $\gamma$ -Phosphat direkt im Anschluss an die GTP Bindung erfolgt, um den nukleophilen Angriff durch das Wassermolekül unter  $S_N2$ -Bedingungen zu begünstigen. Bei hGBP1 übernimmt das S73 (bei mGBP2 ebenfalls S73) die Funktion der Koordination des nukleophilen Wasserstoffatoms (Wittinghofer and Gierschik, 2000). Nach dem Start der GTP zu GDP Hydrolyse wird bei p21Ras ein Proton zurück auf das K16 transferiert (Futatsugi et al., 1999). Ein ähnlicher Mechanismus könnte im Falle der GBPs für die Spaltung des  $\gamma$ - aber auch des  $\beta$ -Phosphats zutreffen, so dass eine Serie von Protonübertragungen für den Hydrolyseprozess verantwortlich sein könnte. Konsequenterweise führt die Mutation dieses Lysins bei Ras Proteinen zu herabgesetzten Nukleotidaffinitäten (Sigal et al., 1986; Feig and Cooper, 1988; Powers et al., 1989) und einem dominant negativen Effekt über den WT bezogen auf Zellwachstum und Vitalität der Zellen, der mit der stärkeren Interaktion der Mutanten-Proteine mit den GEF Proteinen im Zusammenhang steht. Auf diese Weise stehen die GEF Proteine in den Zellen, welche die dominant negativen Mutanten von Ras überexprimieren, für die Aktivierung der WT Ras Proteine nicht mehr zur Verfügung (Feig and Cooper, 1988; Feig, 1999). Bei Dynamin ist das korrespondierende K44 in die Stabilisierung des  $\beta$ -Phosphats und der, während des Übergangszustands entstehenden, negativen Ladung involviert (Warnock et al., 1996). Die Lysinmutante von Dynamin hat einen starken dominant negativen Effekt über den WT und zeigt eine Defizienz in GTP-Bindung und -Hydrolyse, wodurch sie einen Verlust der endozytotischen Aktivität bewirkt (Damke et al., 1994; Warnock et al., 1996; Damke et al., 2001). Durch diese Mutation wird die Fähigkeit von Dynamin aufgehoben mit den Mikrotubuli zu ko-lokalisieren und die Zelle zeigt Defekte in Transferrinaufnahme (Herskovits et al., 1993a). Die E-Domäne von Dynamin interagiert mit der G-Domäne *in trans*, wodurch ein stabiles Dimer entsteht, das im Folgenden über die mittlere Domäne und die E-Domäne zu Tetrameren assoziiert. Die Lysinmutante führt zu einer Festigung der Interaktion der G-Domäne mit der E-Domäne gegenüber dem WT (Smirnova et al., 1999). Die Nukleotidbindung könnte diese Interaktion lockern und die Bindung der E-Domäne an eine E-Domäne aus einem

anderen Dynamin-Molekül ermöglichen, wodurch Übergangszustände entstehen, die an der Membran aktiv sind und die Vesikelabschnürung initiieren. In den Mx-Proteinen führt die Mutation des konservierten Lysins (K51N) zum Verlust der Hydrolysefähigkeit und damit zum Verlust der antiviralen Aktivität, was den Schluss nahe legt, dass GTP-Bindung und -Hydrolyse für die biologische Funktion dieses Proteins essentiell sind (Horisberger, 1992; Pitossi et al., 1993; Ponten et al., 1997). Die Irga6-K82A Mutante zeigt zwar Nukleotidaffinitäten vergleichbar zum WT Irga6 (Uthaiyah et al., 2003), bildet jedoch noch Oligomere *in vitro* nach GTP Zugabe. Beim WT Protein dissoziieren die Oligomere nach GTP-Hydrolyse, wohingegen die Oligomere mit der Lysinmutante nicht zerfallen, wodurch es zu keinem GTP-Umsatz kommt (Hunn et al., 2008). Die Mutante Irga6-K82A ist auch *in vivo* konstitutiv aktiv (Hunn et al., 2008).

In der Struktur von hGBP1 nehmen die Aminosäuren 45-52 des G1 Motivs andere Positionen als im Ras-Nukleotid-Komplex ein. Das invariante K51 koordiniert die  $\beta/\gamma$ -Phosphate von GTP (Praefcke et al., 2004), geht aber keine stabilisierende Interaktion mit den Carbonylen der Hauptkette ein. Stattdessen wird die Schleife über Interaktionen mit der Switch II  $_{97}\text{DxxG}_{100}$  Region über Wasserstoffbrückenbindungen von K51 zu T98 stabilisiert (Prakash et al., 2000a). Die Mutation des Lysins 51 von hGBP1 führt zum Verlust der GTPase-Aktivität (Praefcke et al., 2004). Wenn der Effekt der K51A Mutante von mGBP2 auf die mant-GMP-Bindung auf einer direkten Wechselwirkung zwischen K51 und mant-GMP beruht, muss die P-Schleife eine Konformationsänderung durchführen um diese zu ermöglichen. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Seitenkette von K51 auch Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren des Proteins eingeht, wie z. B. mit sauren Aminosäuren der Switch II Region, und so die Gesamtstruktur der P-Schleife und des aktiven Zentrums beeinflusst. Die Mutation verursacht dann eine Unterbrechung dieser Wechselwirkungen und demzufolge die Inhibition der Nukleotidbindung (Vetter and Wittinghofer, 2001).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Aminosäure K51 in der P-Schleife essentiell für die Nukleotidbindung, Multimerisierung und die katalytische Aktivität von mGBP2 ist.

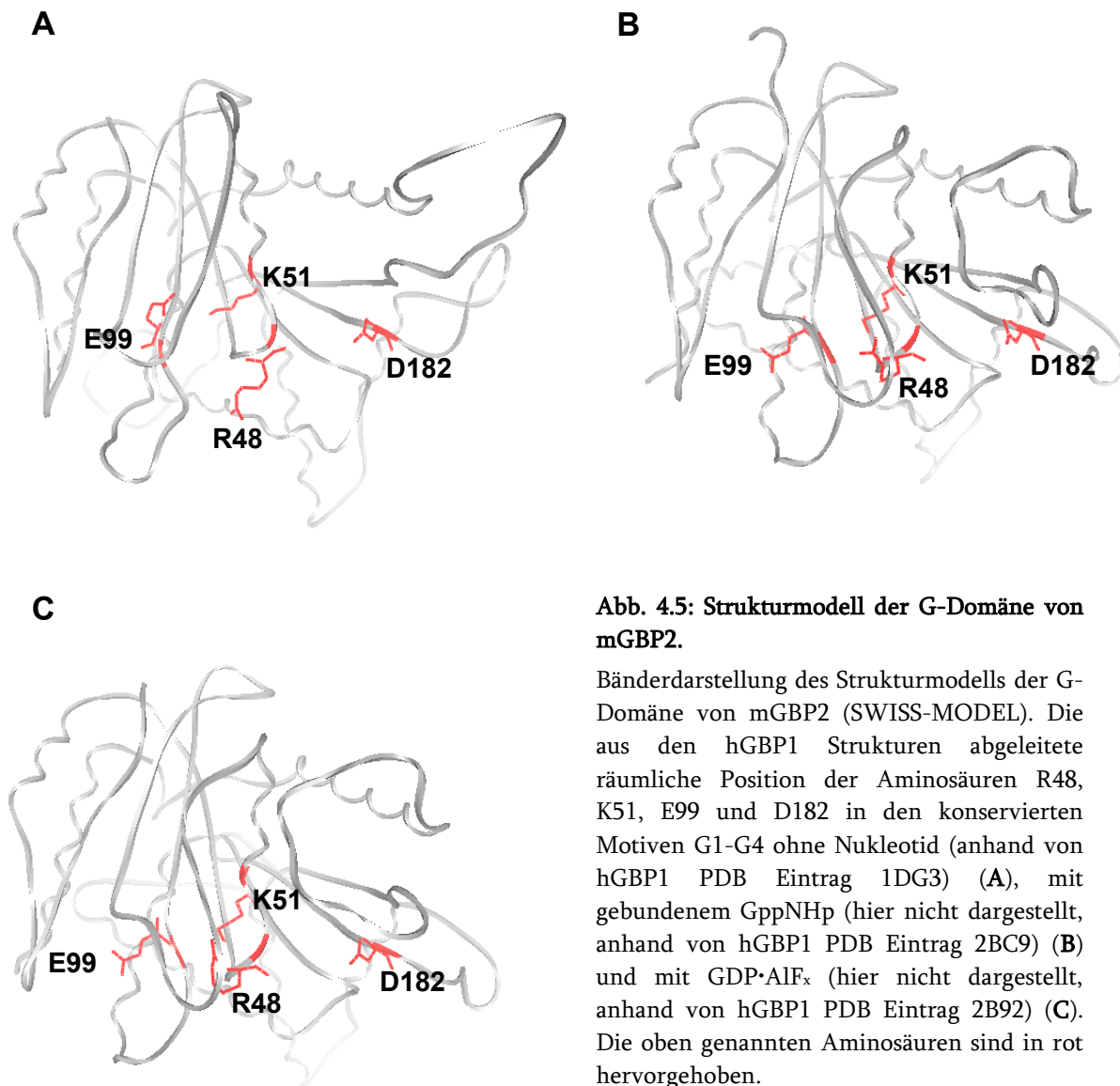
#### 4.2.2 Das Arginin 48 ist der „Arginin-Finger“ von mGBP2

Das R48 in der P-Schleife ist stark in GBPs und den verwandten Atlastinen konserviert (Zhu et al., 2003; Praefcke et al., 2004; Degrandi et al., 2007). Bindungsstudien zeigen, dass für mGBP2 die Mutation dieser Aminosäure zu Alanin nur einen marginalen Einfluss auf die Affinitäten zu mant-GTP $\gamma$ S, mant-GDP und mant-GMP hat. Die Bindung zu mant-GppNHp wird jedoch signifikant fester (s. Anhang Abb. A, Tab. A). Ein ähnliches Phänomen wurde für die Bindungseigenschaften für dieses Nukleotid bei der korrespondierenden Mutante von hGBP1 beobachtet (Praefcke et al., 2004) und wird mit einer verringerten Interaktionsdynamik zwischen Protein und Nukleotid erklärt. Die Bindung zu mant-GDP ist bei der hGBP1-R48A Mutante dreifach schwächer als beim entsprechenden WT Protein. Bei mGBP2 ist dieses Arginin für die GTP-Hydrolyse von besonderer Bedeutung. Die Mutation reduziert die GTPase-Aktivität um zwei Größenordnungen verglichen mit der maximalen Aktivität des WT und die Kooperativität tritt erst bei sehr hohen Proteinkonzentrationen auf, was sich im zehnfach höheren Wert für die Dimerkonstante äußert. Die GMP-Produktion ist stark eingeschränkt (35%), was auf eine Rolle für diese Aminosäure während des zweiten Hydrolyseschrittes hindeutet, wobei angenommen werden kann, dass ein Monomer als das GAP für das andere fungiert. Die Mutante zeigt zwar immer noch eine Tendenz zur GTP $\gamma$ S- und GDP-abhängigen Dimerisierung, ist jedoch nicht mehr in der Lage den tetrameren Übergangszustand aufrechtzuerhalten und ist in Gegenwart von GDP $\cdot$ AlF $_x$  monomer. Folglich blockiert die Mutation nur die Tetramerisierung, nicht aber die Dimerisierung. Die kooperative Hydrolyse von GTP zu GMP ist beim WT von mGBP2, ähnlich wie beim hGBP1 (Praefcke et al., 2004), an die Ausbildung eines Tetramers gekoppelt. Der Vergleich mit dem Arginin der  $\alpha$ -helikalen Domäne der Thymidylat-Kinase aus *S. cerevisiae* (Lavie et al., 1998), mit der  $\alpha$ -helikalen Domäne der G $\alpha$  Proteine (Majumdar et al., 2006) und dem Arginin in der P-Schleife von hGBP1 (Prakash et al., 2000a; Ghosh et al., 2006) lässt den Schluss zu, dass das R48 von mGBP2 an der Tetramerisierung und damit der Ausbildung der GTPase-aktiven Konformation beteiligt ist. In den Strukturen von Atlastin ist das entsprechende Arginin in die Dimerisierung involviert (Byrnes and Sondermann, 2011). Die Mutation zu Glutaminsäure verhindert die Dimerausbildung und damit auch eine Fusion der ER-Membranen (Bian et al., 2011). Die Lokalisation von R48 an der putativen Oberfläche des mGBP2-Dimers suggeriert seine Funktion als einen „Arginin-Finger“, welcher bei Ras- und RhoGAPs die GTP-Hydrolyse aktiviert (Ahmadian et al., 1997; Scheffzek et al., 1997; Rittinger et al., 1997a; Rittinger et



al., 1997b). Die korrespondierende Mutation im p120GAP Protein an der Position R789 oder in Neurofibromin an der Position R1276 führt zu einer Destabilisierung der  $AlF_x$  Bindung, was die Wichtigkeit des „Arginin-Fingers“ in der Stabilisierung des Übergangszustandes in der GAP katalysierten GTPase-Reaktion unterstreicht (Ahmadian et al., 1997; Ahmadian et al., 2003). Außerdem ist dieses Arginin bei dem p120GAP Protein kritisch für die Hydrolyse-Reaktion der Ras Proteine, denn die Mutation führt zu einer 1800-fachen Abnahme der katalytischen Aktivität (Ahmadian et al., 1997). Affinitätsstudien hingegen zeigen, dass das Arginin zwar in die Bindung von GTP involviert ist, diese jedoch nicht maßgeblich beeinflusst. Die Kristallstruktur des Ras-GDP- $AlF_3$ -RasGAP-Komplexes zeigt, dass das R789 von p120GAP das katalytische Zentrum von Ras kontaktiert und in die ionische Interaktion mit einem Fluoridliganden von Aluminium an der Bindestelle des  $\gamma$ -Phosphats involviert ist (Ahmadian et al., 1997). Das invariante Arginin der  $G\alpha$  Proteine (R178) stabilisiert die negative Ladung des planaren Phosphatintermediats in der Struktur mit GDP· $AlF_x$ . Es wird vorgeschlagen, dass dieses Arginin für die höhere Hydrolyserate im Vergleich zu p21Ras Proteinen verantwortlich sein könnte (Coleman et al., 1994).

Bei Dynamamin stabilisiert das  $Na^+$ -Ion an der Position des „Arginin-Fingers“, zusammen mit dem  $\beta$ -Phosphat, den Carbonylsauerstoffen von zwei Glycinseitenketten in der Switch I-Region und einem Serin in der P-Schleife das Aluminiumfluorid (Chappie et al., 2010). Diese Art der Koordination ist sehr ähnlich der *cis* Position des R48 von hGBP1 (Ghosh et al., 2006). In der nukleotidfreien Struktur von hGBP1 und im Modell von mGBP2 zeigt die Seitenkette von R48 ins Lösungsmittel (Prakash et al., 2000a, Abb. 4.5 A). Es ist wahrscheinlich, dass nach der GTP-Bindung (Abb. 4.5 B, mGBP2 Strukturmodell anhand von hGBP1 PDB Eintrag 2BC9) das Arginin zum aktiven Zentrum von mGBP2 ausgerichtet wird, wo es die Funktion hat durch die Transaktivierung die kooperative GTPase-Aktivität des Homodimers in einem Mechanismus ähnlich dem des „Arginin-Fingers“ von GAP Proteinen zu stimulieren (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Strukturmodell der G-Domäne von mGBP2.**

Bänderdarstellung des Strukturmodells der G-Domäne von mGBP2 (SWISS-MODEL). Die aus den hGBP1 Strukturen abgeleitete räumliche Position der Aminosäuren R48, K51, E99 und D182 in den konservierten Motiven G1-G4 ohne Nukleotid (anhand von hGBP1 PDB Eintrag 1DG3) (A), mit gebundenem GppNHp (hier nicht dargestellt, anhand von hGBP1 PDB Eintrag 2BC9) (B) und mit GDP·AlF<sub>x</sub> (hier nicht dargestellt, anhand von hGBP1 PDB Eintrag 2B92) (C). Die oben genannten Aminosäuren sind in rot hervorgehoben.

Durch den Kontakt zum Sauerstoffatom des  $\gamma$ -Phosphats stabilisiert das Arginin die negative Ladung, die während des Übergangszustand der GTP-Hydrolyse (Abb. 4.5 C Strukturmodell mit GDP·AlF<sub>x</sub>) entsteht (Ahmadian et al., 1997; Scheffzek et al., 1997; Rittinger et al., 1997b; Prakash et al., 2000a; Prakash et al., 2000b; Vetter and Wittinghofer, 2001; Ghosh et al., 2006).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen den Schluss zu, dass die Aminosäure R48 in der P-Schleife von mGBP2 eine Funktion bei der nukleotidabhängigen Selbstassemblierung und der Stimulation der GTPase-Aktivität, vergleichbar dem „Arginin-Finger“ der GAP Proteine, erfüllt.

### 4.2.3 Die Glutaminsäure 99 in der Switch II Region ist notwendig für eine effiziente GMP-Produktion

Bei Ras Proteinen interagiert das Lysin in der P-Schleife mit der Seitenkette der invarianten Glutaminsäure (Goldberg, 1998; Vetter and Wittinghofer, 2001). Eine Glutaminsäure ist auch in der Switch II Region der GBPs konserviert (Praefcke et al., 2004). Die Mutation des E99 in der Switch II Region von mGBP2 hat nur einen geringen Effekt auf die Nukleotidbindung, wobei die Bindung zu mant-GDP und das GTP-Analogon mant-GppNHp (s. Anhang Abb. A, Tab. A) etwas schwächer als beim WT ist. Im Gegensatz dazu bindet die korrespondierende Mutante von hGBP1 mant-GppNHp deutlich weniger affin als das entsprechende WT Protein (Praefcke et al., 2004). Die E99A Mutante von mGBP2 beeinflusst jedoch stark die GTPase-Aktivität. Dies äußert sich in niedriger Aktivität, vor allem aber in einer drastisch reduzierten GMP-Produktion (7% vs. 74% beim WT). Aus der Literatur ist bekannt, dass bei hGBP1 die Switch II Region, neben der Switch I Region, starken konformationellen Veränderungen im Prozess der Hydrolyse von GTP zu GDP unterworfen ist (Praefcke et al., 2004). In den Strukturmodellen von mGBP2 erkennt man, dass die Aminosäure E99 nach der Nukleotidbindung eine Umklappbewegung vollführt (Abb. 4.5 A, B). Es lässt sich daher für mGBP2 schlussfolgern, dass die Aminosäure E99 direkt in den katalytischen Prozess involviert ist und für die GMP-Produktion notwendig ist. Dabei könnte das E99 den Übergangszustand stabilisieren, vergleichbar der Funktion von Q61 in Ras und Q204 in G $\alpha$ 1 Proteinen (Coleman et al., 1994; Scheffzek et al., 1997; Buhrman et al., 2010). Es wird angenommen, dass das Q61 in Ras die Funktion der Generalbase übernimmt (Frech et al., 1994). Beachteswert ist dabei die Tatsache, dass die Q61E Mutation zu einer über 20-fachen Steigerung der GTP-Hydrolyserate führt (Maegley et al., 1996). Die Mutation E99A in mGBP2 inhibiert wahrscheinlich die Konformationsänderungen, die für den zweiten Hydrolyseschritt erforderlich sind. Die Folge ist die Inaktivierung des katalytischen Dimers durch Dissoziation und die Freisetzung von GDP. Die GTPase-Aktivität und das Produktverhältnis könnten von der Stärke der Interaktion zwischen den verschiedenen GBP-Molekülen, also vom Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten von Hydrolyse und Dissoziation, beeinflusst werden. Dieser Umstand spiegelt sich in der 10-fach erhöhten Dimerisierungskonstante der E99A Mutante gegenüber dem WT wieder. Die geringe Produktion von GMP durch hGBP2 kann tatsächlich auf eine schwache Molekülinteraktion zurückgeführt werden (Neun et al., 1996). Mutationen in Switch I und Switch II Regionen von Dynamin haben ebenso nur einen marginalen Effekt auf die

GTP-Bindung, setzen jedoch die GTPase-Aktivität herab (Marks et al., 2001). Die Switch II Region (136–153) zusammen mit der „Trans-Stabilisierungsschleife“ (176–188) befinden sich an der Dimerisierungsoberfläche der G-Domänen von Dynamin und sind in die intermolekularen Wechselwirkungen involviert (Chappie et al., 2010). GTP-Hydrolyse Mutanten in den Switch Regionen von Atlastin 1 zeigen deutliche Defekte bei der ER-Membranfusionsaktivität und verursachen, wie auch die entsprechenden Mutanten in den konservierten Aminosäuren der P-Schleife von Atlastin 1, die Krankheit spastische Paraplegie (Bian et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aminosäure E99 in der Switch II Region von mGBP2 in die GTP-Hydrolyse involviert ist und die Stabilität des Multimers beeinflusst.

#### **4.2.4 Die konservierte Asparaginsäure 182 bestimmt die Spezifität für Guaninnukleotide**

Die G4 Region in GBPs und Atlastinen ist, anstatt der klassischen N/KTxD Sequenz in Ras, Rab, Dynamin, Mx und IRGs (Cheng et al., 1983; Cheng et al., 1991), nur in Form eines reduzierten RD Motivs konserviert (Praefcke et al., 1999; Prakash et al., 2000b; Zhu et al., 2003). Die Funktion der G4 Region in mGBP2 wurde durch die Mutation der Asparaginsäure 182 untersucht. Dabei konnte belegt werden, dass die D182N Mutation die Affinität zu GDP und den beiden GTP-Analoga GTP $\gamma$ S und GppNHp herabsetzt. Die Bindungskonstanten für diese drei Nukleotide werden durch die D182N Mutation auf den Bereich zwischen 9 und 18  $\mu$ M egalisiert. Bei hGBP1 führt die entsprechende Mutation zu einer vergleichbar starken Reduktion der Nukleotidbindung, wobei eine erheblich stärkere Beschleunigung der Nukleotiddissoziation der Grund für die schwächere Bindung ist (Praefcke et al., 2004). Die ohnehin schwächere Bindung von mant-GMP an mGBP2 wird durch die verringerte Affinität zu Guaninnukleotiden infolge der D182N Mutation annulliert. Die Mutation an der äquivalenten Position in Ras (D119) führt zu einer 20-fachen Erniedrigung der Affinitäten zu GTP und GDP (Sigal et al., 1986).

In der Bindungstasche von hGBP1 geht die konservierte Asparaginsäure des vierten GTP-Bindungsmotivs Wechselwirkungen mit der Guaninbase über eine doppelte Wasserstoffbrücke ein (Prakash et al., 2000b). Die Spezifität ist durch die sterischen Vorgaben bedingt (Praefcke et al., 1999). Die Base hat durch Wasserstoffbrücken zusätzlichen Kontakt zu R240 (R238 bei GBP2). Dieses Arginin ist bei den GBPs streng

konserviert. Aus der Bindung der Guaninbase an die Asparaginsäure resultieren Konformationsänderungen, die im Folgenden die Bindung des Nukleotids an die Phosphatbindungsregion ermöglichen, wie es für Ras Proteine in der Struktur von Ras-Sos vorgeschlagen wurde (Boriack-Sjodin et al., 1998). Bei Dynamin bestimmt die korrespondierende Aminosäure D208 im G4 Motiv (<sub>205</sub>TKLD<sub>208</sub>) die Nukleotidspezifität (Chappie et al., 2010). Der Austausch von Asparaginsäure in diesem Motiv gegen ein Asparagin resultiert in einer Veränderung der Spezifität von Guanin zu Xanthin in vielen GTP-Bindenden Proteinen wie G $\alpha$  (Yu et al., 1997), Ras (Zhong et al., 1995; Schmidt et al., 1996) und EF-Tu (Weijland and Parmeggiani, 1993). Dies gilt auch für hGBP1 (Praefcke et al., 1999). Die Rolle von D182 in mGBP2 könnte daher, analog zu der Funktion der kanonischen Asparaginsäure der GTPasen, in der Erkennung der Guaninbase liegen. Konsequenterweise ist die Dimerisierungsfähigkeit der D182N Mutante bei geringen Nukleotidkonzentrationen beeinträchtigt. Die Dimeraffinität ist um zwei Größenordnungen erniedrigt im Vergleich zu WT mGBP2. Dies könnte jedoch unter zellulären GTP-Konzentrationen kompensiert werden. Durch die schwächere Nukleotidbindung wird auch die GTPase-Aktivität der Mutante beeinflusst. Sowohl die maximale spezifische Aktivität als auch die GMP-Produktion sind verringert. Die herabgesetzten Affinitäten zu mant-Nukleotiden können jedoch nicht hinreichend die starken Effekte auf die Hydrolyse erklären. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Aminosäure essentiell für die Stabilisierung der entsprechenden Guaninbase während der Hydrolysereaktionen ist (Abb. 4.5), sie ist jedoch, im Gegensatz zu K51, nicht direkt an der Hydrolyse beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen sollte die D182N Mutante von mGBP2 dennoch hydrolytisch aktiv sein, allerdings mit geringerer Aktivität und reduzierter GMP-Produktion.

In der Struktur von hGBP1 ist die korrespondierende Aminosäure D184 zum Lösungsmittel exponiert und bietet somit die erste Kontaktfläche für das Nukleotid. Die Mutation könnte den hydrodynamischen Radius des Proteins beeinflussen und damit die Verschiebung des Elutionsprofils des nukleotidfreien und GMP-gebundenen mGBP2-D182N Monomers bei der Größenausschluss-Chromatographie bewirken.

Die Mutation der analogen Aminosäure in Dynamin (D203N) in transfizierten Zellen zeigt keine Unterschiede in der Lokalisation im Vergleich zum WT Dynamin und hat auch keinen Effekt auf die Endozytose (Herskovits et al., 1993a). Im Gegensatz dazu stellt die D184N Mutante von hGBP1 die Expression von MMP-1 wieder her und zeigt einen

dominant inhibitorischen Effekt auf den WT von hGBP1 (Guenzi et al., 2003). Dies belegt die Notwendigkeit einer effektiven GTP-Hydrolyse von hGBP1 für die Erfüllung der physiologischen Funktion.

Aus den gewonnenen Daten für die D182N Mutante von mGBP2 lässt sich schließen, dass diese Asparaginsäure im G4 Motiv für die spezifische Erkennung der Guaninbasen verantwortlich ist.

#### **4.2.5 Das Cystein 586 im CaaX Motiv hat keinen Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften von mGBP2**

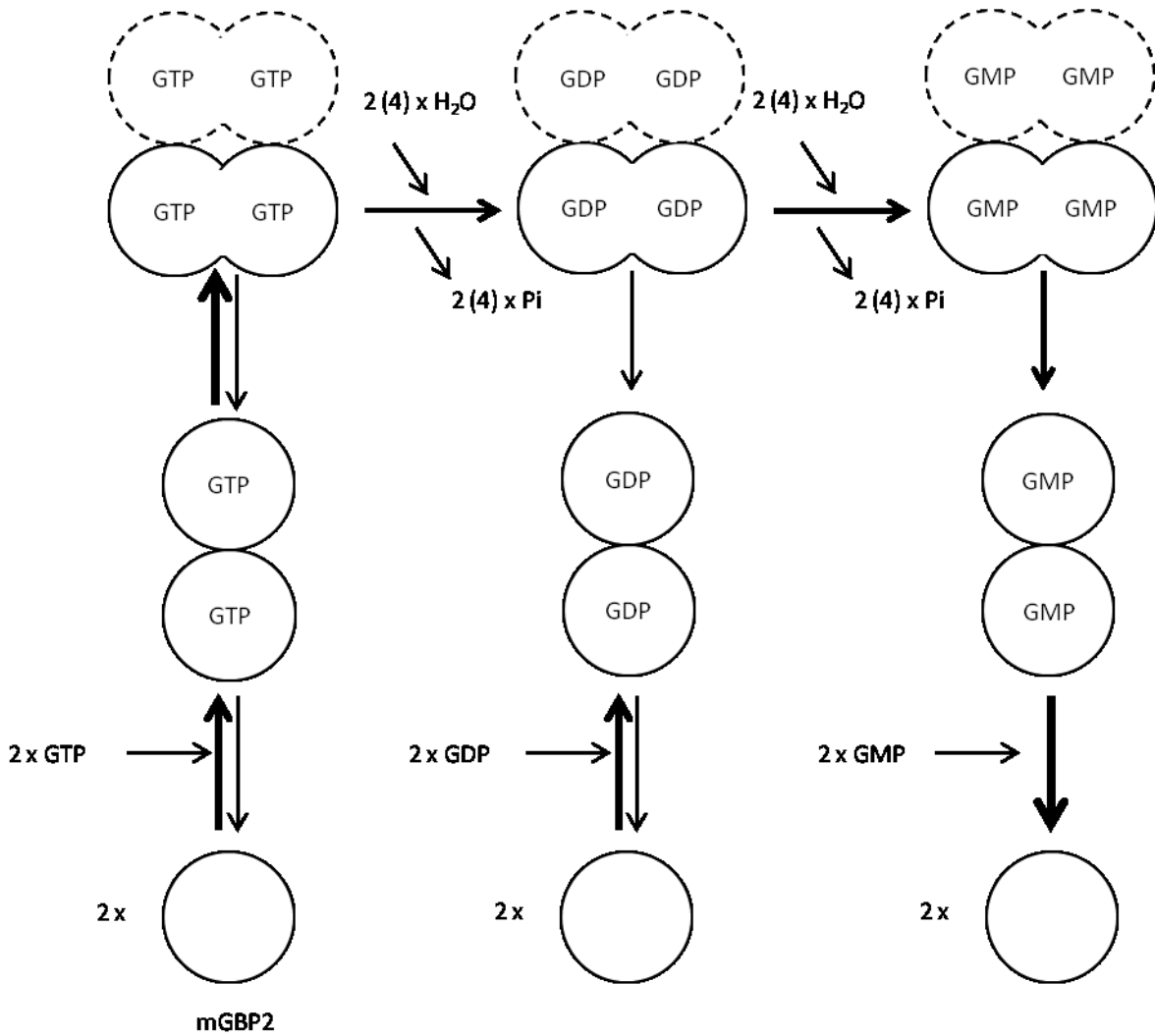
Wie schon erwähnt, werden unter den angewendeten experimentellen Bedingungen rekombinant in *E. coli* exprimierte Proteine nicht posttranslational modifiziert. Die Punktmutation des Isoprenylierungscysteins 586 zu Serin zeigt ein dem WT Protein von mGBP2 entsprechendes biochemisches Profil. Die Mutation der korrespondierenden Aminosäure bei hGBP1 (C589S) resultiert in einem unveränderten Produktverhältnis von GDP/GTP im Vergleich zum dazugehörigen WT Protein (Modiano et al., 2005). Es bleibt unklar, ob der C20 Fettsäurerest einen Einfluss auf die GTPase-Aktivität und das Oligomerisierungsverhalten von mGBP2 nimmt. Die Verknüpfung des Farnesylrestes mit hGBP1 innerhalb eines *E. coli* Überexpressionssystems, in dem sowohl hGBP1 als auch die Farnesyltransferase ko-exprimiert werden, führt zu einer zweifachen Erhöhung der Dimerisierungskonstanten bei bleibender maximaler Aktivität und zu einer deutlichen Erniedrigung der GMP Produktion (85% unmodifiziert und 30% modifiziert, Fres et al., 2010). Dies könnte durch die schwächeren Interaktionen des Tetramers des farnesylierten Proteins erklärt werden, das transient während der GTP-Hydrolyse entsteht. Die daraus resultierende kürzere Lebensdauer dieses Zustandes könnte das Gleichgewicht vom zweiten Hydrolyseschritt in Richtung der irreversiblen Dissoziation des Oligomers verschieben (Kunzelmann et al., 2006). Eine mögliche physiologische Implikation eines solchen Isoprenylierungseinflusses könnte der Rationalisierung des GTP-Verbrauchs, also der Aufrechterhaltung der GTP-Homöostase dienen.

In *E. coli* ist die Konzentration von Geranylgeranylpyrophosphat recht niedrig, es wurde jedoch kürzlich berichtet, dass eine Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase in *E. coli* aktiv exprimiert und die Menge an diesem Phospholipid damit erhöht werden kann (Albermann et al., 2008). Auf diese Weise könnte in der Zukunft rekombinantes

isoprenyliertes mGBP2 exprimiert und anschließend der Einfluss der Lipidmodifikation auf die biochemischen Eigenschaften des Proteins untersucht werden.

#### **4.2.6 Der Mechanismus der Hydrolyse von GTP über GDP zu GMP durch mGBP2**

Basierend auf den Erkenntnissen aus den biochemischen Experimenten lässt sich ein Modell für den molekularen Mechanismus der GTP-Hydrolyse von mGBP2 aufstellen. Aufgrund der intrazellulären GTP-Konzentration bindet das Protein hauptsächlich GTP, wodurch es in die Lage versetzt wird Dimere auszubilden. Beide Monomere werden als katalytisch aktiv angenommen und katalysieren jeweils die Hydrolyse von Phosphationen in zwei aufeinander folgenden Schritten. Während der Hydrolyse-Reaktion entsteht ein tetramerer Übergangszustand, der die GTPase-Aktivität stimuliert. Nach der Hydrolyse der  $\gamma$ -Phosphatgruppe liegt das Protein im GDP-gebundenen Zustand vor. An dieser Stelle setzt die Gabelung der möglichen Reaktionswege ein. Das Intermediat kann entweder das gebundene GDP zu GMP hydrolysieren oder zu GDP-gebundenen Dimeren und weiter zu Monomeren unter Freisetzung von GDP dissoziieren. Die relativen Geschwindigkeiten dieser beiden kompetitiven Schritte bestimmen das Produktverhältnis der Reaktion. Bei 37°C durchläuft die GDP-Konzentration ein Maximum von etwa 25%, damit ist die Geschwindigkeit der Hydrolyse von GTP zu GDP etwa dreimal langsamer als die nachfolgende Hydrolyse des intermediär gebildeten GDP zu GMP und darum ist GMP das Hauptprodukt. Für die Inaktivierung des Enzymkomplexes nach längerer Reaktionszeit ist jedoch sowohl die Produktinhibition als auch der mechanische Verschleiß der Proteine verantwortlich. Der GMP-gebundene Komplex dissoziiert ebenfalls schnell zu Dimeren und weiter zu Monomeren. Die GMP- oder GDP-gebundenen Monomere tauschen dann schnell das gebundene Nukleotid gegen GTP aus der Lösung aus und sind für die nächste Runde bereit, wodurch hohe Umsatzraten erzielt werden. Die direkte Bildung von GMP- oder GDP-gebundenen Di- (Tetra-)meren ist deutlich langsamer als die Erzeugung der Intermediate ausgehend aus der GTP-Hydrolyse und darum wird aus der Lösung aufgenommenes GDP nicht zu GMP hydrolysiert. Abbildung 4.6 fasst den postulierten Mechanismus zusammen.



**Abb. 4.6: Schematisches Modell der oligomerisierungsinduzierten GTPase-Aktivität von mGBP2.**

In Abwesenheit von GTP befindet sich das Protein im monomeren Zustand. Nach GTP-Bindung formt das Protein ein Dimer. Der Prozess der Nukleotidbindung, der zur Oligomerisierung führt, wird dabei als schnell angenommen. Die Aktivität der Hydrolyse steigt durch die kooperative Wechselwirkung der Di-/Tetramere, die während des Übergangszustandes entstehen. Der zweite Hydrolyseschritt ist schneller als der erste, so dass nur ein geringer Anteil der GDP-gebundenen Di-/Tetramere in GDP-gebundene Monomere dissoziiert, woraufhin eine GDP-Freisetzung erfolgt. Die relativen Geschwindigkeiten der einzelnen Reaktionen bestimmen, welcher Weg für das Protein der bevorzugte ist. Die Produktpräferenz wird durch das Geschwindigkeitsverhältnis des zweiten Hydrolyseschrittes zur GDP-Di-/Tetramer-Dissoziation entschieden.

Das Modell liefert jedoch keine Auskunft über die basale GTPase-Aktivität des WT Proteins im mono- und dimeren Zustand und wirft die Frage nach der eigentlichen Ursache der Stimulation der GTPase-Aktivität auf, die in IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen induziert wird.



### 4.3 Biologische Implikationen der biochemischen Eigenschaften von mGBP2

Die GBPs gehören zu den am stärksten exprimierten Genen nach IFN- $\gamma$  Stimulation und können bis zu 20% des Gesamtproteoms der Zelle ausmachen (Cheng et al., 1983). Sie treten immer mehr in den Vordergrund als Effektormoleküle des zellautonomen Abwehrsystems gegen intrazelluläre Pathogene. Durch den Vergleich mit den anderen anti-mikrobiellen IFN induzierbaren GTP-bindenden Proteinfamilien, wie Mx und IRGs können, trotz Mannigfaltigkeit und Spezifität der zellulären Aufgaben, die allgemeinen Prinzipien der GBPs verstanden werden. Die biochemischen Untersuchungen der Nukleotidbindung und -Hydrolyse und Selbstatsemblierung von mGBP2 stellen das Fundament für die Aufklärung der biologischen Funktion der GBP Proteine dar und sollen in dieser Arbeit helfen, die Rolle von mGBP2 im zellautonomen Abwehrsystem in einem Infektionsmodell mit dem intrazellulären Parasiten *T. gondii* aufzudecken.

#### 4.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von mGBP2 und Mutanten

Neben der Analyse der biochemischen Profile wurde auch die subzelluläre Verteilung von mGBP2 und dessen Mutanten in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) untersucht. Hierfür wurden mGBP2 defiziente MEFs stabil mit GFP-mGBP2 Fusionsplasmiden transduziert oder das endogene mGBP2 mit einem spezifischen Antiserum gefärbt (Degrandi et al., 2007). Dabei sollte mit Hilfe der G-Domänen- und Trunkationsmutanten, wie auch der Isoprenylierungsmutante von mGBP2 die Bedeutung der einzelnen Domänen, der GTP-Affinität, Oligomerisierung, Hydrolyserate und der Lipidmodifikation für die intrazelluläre Lokalisation des Proteins untersucht werden. Dazu wurde die subzelluläre Verteilung der Proteine zunächst mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert.

Das endogene mGBP2 Protein liegt innerhalb des Zytosols in vesikulären Strukturen heterogener Größe vor, wie es bereits früher für mGBP2 beschrieben wurde (Vestal et al., 2000; Vestal, 2005; Degrandi et al., 2007; Dissertation C. Konermann, 2008). Das rekonstituierte WT Fusionsprotein lokalisiert in vesikulären Strukturen vergleichbar mit denen des endogenen Proteins und stellt damit eine geeignete Positivkontrolle dar. Die N-terminale Fusion von hGBP1, 2 und 5 mit dem GFP-Protein hatte ebenfalls keinen Einfluss auf ihre subzelluläre Lokalisation (Britzen-Laurent et al., 2010). Im Gegensatz

dazu ist für die IRG Proteine gezeigt worden, dass größere Fluoreszenzmarker die Oligomerisierung und die Lokalisation negativ beeinflussen (Zhao et al., 2010). Für mGBP2 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben der Isoprenylierung eine funktionale GTP-Bindedomäne für die vesikuläre Lokalisation erforderlich ist. Den ersten Hinweis darauf liefern die Ergebnisse in nicht stimulierten Zellen. Im Gegensatz zum WT-Konstrukt lokalisiert keine der Mutanten in vesikulären Strukturen ohne IFN- $\gamma$  Stimulation. Alle Mutanten weisen eine homogene zytosolische Verteilung auf. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Ausbildung dieser intrazellulären Strukturen abhängig von der proteinintrinsischen Selbstassemblierung ist und hierfür keine weiteren IFN- $\gamma$  induzierbaren Faktoren benötigt werden. Die „Multiparameter Fluorescence Image Spectroscopy“ (MFIS) Analyse auf der Basis von homo-FRET Experimenten zeigte, dass das WT GFP-Konstrukt ohne IFN- $\gamma$  Stimulation in multimeren Komplexen innerhalb der vesikulären Strukturen, aber auch bereits im Zytosol assembliert, was an der niedrigeren Anisotropie gegenüber der oligomerisierungsdefizienten K51A Mutante festgemacht werden kann (siehe Anhang, Abb. F, Tab. B, Kravets et al., 2012). Der Multimerisierungsstatus von mGBP2 innerhalb der vesikulären Strukturen wurde jedoch nach IFN- $\gamma$  Vorstimulation der Zellen deutlich erhöht, was sich in reduzierten Werten für Anisotropie äußert. Diese Beobachtung legt nahe, dass weitere IFN- $\gamma$  induzierte Faktoren die vesikuläre Verteilung von mGBP2 verstärken können.

Da die Mutanten die GTPase-Funktion an verschiedenen Reaktionsschritten inhibieren, lässt sich vermuten, dass sowohl Bindung und Hydrolyse, als auch die während der Hydrolyse erfolgende Multimerisierung für die korrekte Lokalisation erforderlich sind, wie es auch für hGBP1 postuliert wird (Praefcke et al., 2004; Vopel et al., 2010). In IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen kann die Fehllokalisierung einiger Mutanten wiederhergestellt werden. Besonders betroffen bleiben jedoch die beiden Bindungsmutanten K51A und D182N. Das Maß der Fehllokalisierung korreliert dabei mit dem Maß an GTP-Bindungs- und Oligomerisierungsdefekten. Die P-Schleifenmutante K51A bleibt auch nach der Stimulation mit IFN- $\gamma$  homogen im Zytosol verteilt. Biochemisch ist diese Mutante dysfunktional und weist schwere Defekte sowohl bei der Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse als auch bei der Oligomerisierung auf. Die Unfähigkeit den tetrameren Übergangszustand auszubilden könnte der Grund für den Verlust der vesikulären Lokalisation trotz posttranslationaler Isoprenylierung sein. Die G4 Motiv D182N-Mutante, bei der die spezifische Erkennung und Bindung der Guaninbase reduziert ist, lokalisiert nur noch partiell vesikulär nach IFN- $\gamma$  Behandlung. Die Fähigkeit dieser

Mutante zu dimerisieren ist 100-mal schwächer als beim WT und die Hydrolyseaktivität ist aufgrund verringerter Kooperativität drastisch reduziert. Daraus folgt, dass es auf der zellulären Ebene bei dieser Mutante wahrscheinlich deutlich weniger tetramere membranorientierte Komplexe gibt. Eine partielle Rekonstitution der vesikulären Verteilung wäre z. B. aufgrund einer Heterodimerisierung mit anderen GBPs denkbar (Britzen-Laurent et al., 2010). Die Homologie insbesondere, bei den GTPase-Domänen (Kresse et al., 2008), der verwandten GBP Proteine lässt die Spekulation über ein solches Szenario zu. Die Heterodimerisierung der jeweiligen G-Domänen nach GTP-Bindung könnte zur Stimulation der Hydrolyseaktivität führen und dabei die Strukturveränderungen induzieren, die für eine Membranassoziation notwendig sind. Die K51A Mutante kann eine solche Heterodimerisierung nur in einem stark verringerten Maße eingehen und bleibt daher fehllokalisiert. Diese Hypothese wird auch durch die auf Anisotropiemessungen basierten homo-FRET Experimente bestätigt. Die K51A Mutante ist stärker anisotrop als der WT in unstimulierten Zellen und stellt damit den monomeren Zustand von mGBP2 dar. Die Anisotropie der K51A Mutante wird auch nach der IFN- $\gamma$  Stimulation nicht signifikant erniedrigt (s. Anhang, Abb. F, Tab. B, Kravets et al., 2012). Im Gegensatz zu der inaktiven K51A Mutante von mGBP2, ist die Irga6-K82A Mutante konstitutiv aktiv und im GTP-gebundenen Zustand fixiert. Sie aggregiert im Zytoplasma und hindert das endogene WT Irga6 Protein daran, am glatten ER zu lokalisieren (Hunn et al., 2008).

Die beiden anderen Hydrolysemutanten von mGBP2 R48A und E99A, die GTP-anhängig dimerisieren, akkumulieren in intrazellulären Strukturen vergleichbar denen des WT-Proteins nach IFN- $\gamma$  Stimulation. Die „Arginin-Finger“-Mutante R48A könnte in IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen durch gemischte Di- oder Tetramerisierung mit anderen GBPs die GTPase-Aktivität wiedererlangen und der katalytische Defekt der Switch II Mutante E99A könnte durch Heterodimerisierung möglicherweise zum Teil kompensiert werden. In Ko-Immunpräzitationsstudien mit mGBP1 und dessen R48A und K51A Mutanten konnte eine direkte Wechselwirkung mit mGBP2 und mGBP5 nur für das WT mGBP1 Protein und die R48A Mutante, jedoch nicht für die K51A Mutante gezeigt werden (Virreira et al., 2011).

Sämtliche trunke Mutanten von mGBP2 haben ihre vesikuläre Verteilung unabhängig von der IFN- $\gamma$  Stimulation eingebüßt. Die isolierte G-Domäne von hGBP1 weist veränderte katalytische Eigenschaften im Vergleich zum entsprechenden WT Protein

dahingehend auf, dass für die Stimulation der GTPase-Aktivität keine Tetramerisierung erforderlich ist. Außerdem setzt sie extrinsisch hinzugegebenes GDP zu GMP um (Prakash et al., 2000b; Dissertation G. Praefcke, 2001). Der G-Domäne von mGBP2 und hGBP1 (Vopel et al., 2010) fehlt sowohl die, für die Membranbindung von vielen GTPasen verwendete, polybasische Sequenz als auch die Isoprenylierung, wodurch die Bindung an Membranen nicht erfolgen kann und beide Proteine ihre vesikuläre Verteilung verlieren (in dieser Arbeit gezeigt für mGBP2 und Vopel et al., 2010 für hGBP1). Besonders interessant ist jedoch, dass die G-Domäne von hGBP1 zur Tetramerisierung unfähig ist, weil diese über den helikalen Teil der C-terminalen Domäne vermittelt wird (Vopel et al., 2010). Gesetzt den Fall, dieses Modell würde für die G-Domäne von mGBP2 gelten, ist die Fehllokalisation der G- und GM-Domänen die logische Konsequenz. Eine mögliche Assoziation der E-Domänen von mGBP2 miteinander erfüllt wahrscheinlich nicht die Konformationsbedingungen, die für die membranorientierte Ausrichtung der Isoprenylierungseinheiten erforderlich sind, weil die Kontrolle durch die GTPase-Domänen fehlt. Dieses Ergebnis ergänzt die oben formulierte Hypothese damit, dass alle drei Domänen und die Lipidmodifikation für die korrekte intrazelluläre Lokalisation von mGBP2 erforderlich sind. Für die Ras35 GTPase-Mutanten, die entweder keine GTPase-Domäne oder kein CaaX-Motiv aufweisen, wurde ebenfalls eine Fehllokalisation detektiert (Heo et al., 2006). Durch die Mutation in hGBP1, die zu einer Aufhebung der Interaktion zwischen der G- und der E-Domäne führt (hGBP1(loose  $\alpha$ 12/13)), wird die wenig vesikuläre Verteilung von WT-hGBP1 deutlich verstärkt und resultiert in einer visuell strukturierteren Lokalisation des Proteins im Zytosol (Vopel et al., 2010) und sogar in einer Assoziation mit der Plasmamembran, wahrscheinlich durch die Interaktion des polybasischen Clusters zusammen mit dem Farnesylrest mit Phosphoinositolphosphat-(PIP)-Lipiden (Hancock et al., 1991; Heo et al., 2006). Der GTP-Umsatz oder das Produktverhältnis ändern sich durch diese Mutation jedoch nicht dramatisch, sie sind daher unwahrscheinlich für die Verschiebung der Lokalisation verantwortlich. Die vesikuläre Verteilung könnte durch den Verlust der Kontrolle der G-Domäne über die E-Domäne begründet sein, wodurch permanente Interaktionen zwischen den  $\alpha$ 12/13 Helices der GTP-gebundenen Dimere entstehen und dadurch die Abundanz des Proteins im tetrameren, membranbindenden Zustand erhöht wird. Konsequenterweise, führt die Deletion der C-terminalen Domäne von hGBP1 (hGBP1(delete  $\alpha$ 12/13)) zur homogenen zytosolischen Verteilung des Proteins (Vopel et al., 2010), weil eine Membranverankerung ohne CaaX-Motiv nicht möglich ist.

Die Überexpression der dominant negativen Mutanten der GTPase-Domäne von Dynamin führt zur Akkumulation unterschiedlicher Intermediate der durch Dynamin katalysierten Prozesse (Damke et al., 2001) und zeigt deutlich, dass GTP-Bindung und -Hydrolyse essentiell für die Funktion von Dynamin *in vivo* sind. Die Dimerisierung von Dynamin nach GTP-Bindung reguliert die Membranassoziation (Ramachandran and Schmid, 2008; Pucadyil and Schmid, 2009). Die Membranassoziation der humanen GBPs wird ebenfalls über Homo- und Heterodimerisierung reguliert (Britzen-Laurent et al., 2010). Die *in vivo* prenylierten hGBP1, hGBP2 und hGBP5 beeinflussen die gegenseitige Lokalisation in einer hierarchischen Art und Weise. So rekrutiert hGBP1 hGBP5 und hGBP2 in dessen intrazelluläres Kompartiment und hGBP5 erzwingt die Relokalisation von hGBP2 (Britzen-Laurent et al., 2010).

Interessant ist auch die Tatsache, dass mGBPs, die keine putative Isoprenylierungssequenz enthalten (mGBP3, 6, 7, 9, 10), ebenfalls in der Zelle vesikulär angeordnet sind (Degrandi et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass humane prenylierte GBPs nicht-prenylierte GBPs über Dimerisierung in ihre jeweiligen Kompartimente *in vivo* dirigieren können (Britzen-Laurent et al., 2010).

Die Lipidmodifikation ist ein Mechanismus, der es zytosolischen Proteinen ermöglicht Interaktionen mit Membranen einzugehen, wodurch ihre Lokalisation und biologische Aktivität reguliert wird (Nantais et al., 1996; Chavrier and Goud, 1999; Vestal et al., 2000; Stickney and Buss, 2000; Ghosh et al., 2006; Fres et al., 2010). In eukaryotischen Zellen existieren drei Haupttypen der Lipidmodifikationen: N-terminale Myristoylierung, Palmytoylierung und Isoprenylierung. Über einhundert Proteine in eukaryotischen Zellen tragen eine C-terminale CaaX-Box Sequenz, die sie als Substrate für die posttranslationale Isoprenylierung am Cystein ausweist. Diese Modifikation wird im ER entweder durch die Farnesyl-(C15)-Transferase (FTase) oder die Geranylgeranyl-(C20)-Transferase (GGTase) katalysiert, die das entsprechende Pyrophosphat mit dem Protein über ein Thioether verbinden (Zhang and Casey, 1996). Die X Reste in der CaaX-Box bestimmen die Spezifität entweder für die FTase (X = S, A, Q, H, C), die GGTase I (X = L, V), oder für beide Enzyme (X = T, I, F, M), aber auch die aliphatischen "a" Seitenketten tragen zur Spezifität der Isoprenyleinheit bei (Reid et al., 2004). Auf die Isoprenylierung folgen üblicherweise die proteolytische Abspaltung des aaX Peptids und die Methylierung der Carboxylgruppe des Isoprenylcysteins durch die Carboxymethyltransferase, die ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert ist (Dai et al., 1998).

Die CaaX-Box von mGBP2 besitzt die Sequenz <sup>586</sup>CTIL<sub>589</sub> und damit kann postuliert werden, dass mGBP2, wie mGBP1, ein Substrat für die GGTase I darstellt (Stickney and Buss, 2000). Isoprenyliertes mGBP2 lokalisiert sowohl in embryonalen Fibroblasten, als auch in NIH 3T3 Zellen und RAW 264.7 Makrophagen (MΦ) in vesikulären Strukturen innerhalb des Zytosols und die vesikuläre Lokalisation konnte auf die funktionelle Isoprenylierungsstelle zurückgeführt werden (Vestal et al., 2000; Dissertation C. Konermann, 2008 und diese Arbeit). mGBP5 trägt die C-terminale Sequenz CVIS und wird daher wahrscheinlich farnesyliert. Es akkumuliert in einer perinukleären Region in der Zelle (Sarah Lahme, persönliche Information). Am Cystein 586 mutiertes mGBP2, kann nicht mehr isoprenyliert werden und ist homogen zytosolisch verteilt. Diese Fehllokalisierung kann auch durch IFN- $\gamma$  induzierbare Faktoren nicht mehr rekonstituiert werden (Vestal et al., 2000; Degrandi et al., 2012, eingereicht, diese Arbeit). Der analogen Mutante von hGBP1 (C589S) fehlt die Fähigkeit zur Anlagerung an den Golgi-Apparat nach kombinierter IFN- $\gamma$  Stimulation und AIF<sub>x</sub> Behandlung.

Neun von 23 IRGs sind N-terminal myristoyliert (Martens et al., 2004). Diese posttranslationale Modifikation erlaubt es den Proteinen die innere Schicht von Lipidmembranen zu binden. Die p47 GTPasen differieren jedoch in ihrer intrazellulären Lokalisation. Aus einer Kombination von biochemischen und mikroskopischen Studien geht hervor, dass Irgm3 in der Zelle fast vollständig an das ER gebunden vorliegt, mit einem nur geringen zytosolischen Anteil (Taylor et al., 1997; Hunn et al., 2008). Dabei ist die Lokalisation IFN- $\gamma$  unabhängig. Die isolierte G-Domäne von Irgm1 lokalisiert an der Plasmamembran, das vollständige Protein wird hingegen über eine C-terminale amphipathische Helix und unabhängig von der GTP-Hydrolyse an den Golgi-Membranen festgehalten. Die Assoziation mit dem endolysosomalen System bedarf jedoch einer funktionalen Nukleotidbindestelle (Zhao et al., 2010), was die regulatorische Funktion der IRGM Proteine (GMS Sequenz in der P-Schleife) am zellulären Membransystem unterstreicht. Irga6 wurde zum Teil am ER, aber auch am Golgi-Apparat und im Zytosol detektiert (Zerrahn et al., 2002; Hunn et al., 2008). Die Mutation eines Glycins in der N-terminalen Myristoylierungssequenz von Irga6 (<sup>1</sup>MGQLFS<sub>6</sub>) führt nach der Solubilisierung mit Triton X-114 zu einer kompletten Überführung des Proteins in die wässrige Phase (Martens et al., 2004). Unter hypotonischen Bedingungen bleibt die Mutante allerdings partiell membranassoziiert, was zeigt, dass die Myristoylierung zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die Lipidbindung ist und dass zusätzlich die

hydrostatischen und die ionischen Interaktionen eine wichtige Rolle für die Membranassoziation spielen (Ghosh et al., 2004).

hGBP1 wird an seinem CTIS Motiv farnesyliert (Cheng et al., 1991; Schwemmle and Staeheli, 1994; Fres et al., 2010). Diese Modifikation ist essentiell für die Rekrutierung dieses Proteins vom Zytosol zum Golgi-Apparat in Zellen, die mit  $AlF_x$  behandelt wurden (Modiano et al., 2005). Unter diesen Bedingungen bildet hGBP1 *in vivo* einen tetrameren Komplex mit  $GDP \cdot AlF_x$ , der den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse widerspiegelt (Mittal et al., 1996; Prakash et al., 2000a). Es wird daher angenommen, dass das Protein in seinem GTP-gebundenen Zustand in der Lage ist, innerhalb der zellulären Kompartimente zu migrieren. Mit Hilfe der Zuckergradienten-Zentrifugation konnte gezeigt werden, dass diese Relokalisation zwingend an eine funktionale GTP-Bindedomäne und an die Farnesylierung gebunden ist. Sowohl die Inhibition der FTase als auch die Transfektion der farnesylierungsdefekten C589S Mutante von hGBP1 (Kato et al., 1992) in HeLa Zellen, führen dazu, dass hGBP1 nicht mehr am Golgi-Apparat lokalisiert (Modiano et al., 2005). Ebenso verhält es sich mit der Nukleotidbindungsdefizienten R48P Mutante von hGBP1. Beide Mutanten haben einen dominant negativen Effekt und hindern das endogene WT Protein in Anwesenheit von  $AlF_x$  an der Rekrutierung zum Golgi-Apparat. Außerdem benötigt hGBP1 andere  $IFN-\gamma$  induzierbare Faktoren, die seine Lokalisation am Golgi-Apparat sicherstellen, denn konstitutiv exprimiertes hGBP1 ohne  $IFN-\gamma$  Stimulation bleibt in  $AlF_x$  behandelten Zellen zytosolisch in vesikelartigen Strukturen (Modiano et al., 2005).

$AlF_x$  kann die Relokalisation einiger GTPasen zu ihren Zielmembranen induzieren (Finazzi et al., 1994; Radhakrishna et al., 1996). Im Gegensatz zu hGBP1, ändert die  $AlF_x$  Behandlung von WT MEFs nicht die subzelluläre Verteilung von mGBP2, wie es die Lysatfraktionierung anhand des Zuckerdichtegradienten zeigte (s. Anhang Abb. D). mGBP2 eluiert aus dem  $IFN-\gamma$  stimulierten Lysat der MEFs in Fraktionen mit membranösen Kompartimenten (Vestal et al., 2000 und diese Arbeit). Eine Ko-Lokalisation mit bekannten Organellen wie Mitochondrien, Endosomen, Lysosomen, Peroxisomen, ER oder Golgi-Apparat sowie MHC Klasse I Proteinen, konnte bislang aber am Konfokalmikroskop nicht detektiert werden (Vestal et al., 2000; Vestal, 2005; Degrandi et al., 2007; Dissertation C. Konermann, 2008; Traver et al., 2011 und diese Arbeit). Interessanterweise konnte eine Ko-Lokalisation von mGBP2 mit abortiven LC3-positiven autophagosomalen Strukturen mit Hilfe von konfokaler LSM nachgewiesen

werden. Erwähnenswert erscheint in diesem Zusammenhang auch die Bindung von mGBP2 an negativ geladene Phosphoinositolphosphate (PIPs). Die Bindung an das Golgi-assoziierte PI(4)P (Falkenburger et al., 2010) könnte ein Hinweis auf die Sekretion von mGBP2 sein. Das hGBP1 wurde als sekretorisches Protein in der Cerebrospinalflüssigkeit der Patienten mit bakterieller Meningitis beschrieben (Nashberger et al., 2006). PI(4,5)P<sub>2</sub> wird in der Zelle aus Phosphatidylinositol (PI) in zwei Schritten durch die PI 4-Kinase, gefolgt von der PI(4)P 5-Kinase an der Plasmamembran synthetisiert und macht nur etwa 1% der sauren Phospholipide der Zelle aus (Falkenburger et al., 2010). Das PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, häufig PIP<sub>3</sub> genannt, wird ebenfalls an der Plasmamembran hergestellt, wenn Wachstumsfaktorrezeptoren die Phosphoinositid-3-Kinase (PI 3-Kinase) aktivieren, die das PI(4,5)P<sub>2</sub> phosphoryliert (Auger et al., 1989). Die basale Konzentration von PIP<sub>3</sub> ist mit 5 µM sehr niedrig (Vieira et al., 2001). PI(4,5)P<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> sind nicht nur Bestandteile von Plasmamembran, sondern sind auch für neu entstehende phagosomale und autophagosomale Membranen charakteristisch (Tiwari et al., 2009; Falkenburger et al., 2010). Für die p47 GTPase Irgm1 ist eine Interaktion mit PIP<sub>3</sub> im Zusammenhang mit der zellautonomen Resistenz gegen Mykobakterien gezeigt worden (Tiwari et al., 2009). Es vermittelt die zytokinabhängige Reifung und Azidifizierung der mykobakteriellen oder Listerien-Phagosomen, die die Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie in infizierten IFN-γ stimulierten MΦ nach sich ziehen kann (MacMicking et al., 2003; Gutierrez et al., 2004; Singh et al., 2006; Shenoy et al., 2007; Singh et al., 2010; Kim et al., 2011).

Dynamin I bindet das PIP<sub>3</sub>-Motiv über seine PH-Domäne und assoziiert dadurch mit dem Hals des aufkeimenden Clathrin-Vesikels (Wenk and de Camilli, 2004). Für K-Ras, Rab, Arf und RhoA, Rac1 und Cdc42 GTPasen ist ebenfalls die Bindung an PI(4,5)P<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> gezeigt worden (Heo et al., 2006). Sie besitzen eine oberhalb der CaaX-Box lokalisierte polybasische Sequenz, die ihre Affinität zu negativ geladenen Lipiden der Plasmamembran erhöht und die intrazelluläre Lokalisation bestimmt (Hancock et al., 1991). Bei Irgm1 wird die Bindung an PI(3,4)P<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> ebenfalls über eine C-terminale polybasische, hydrophobe amphipatische Helix ([αK] Irgm1<sub>350-374</sub>) *in vitro* und *in vivo* vermittelt (Tiwari et al., 2009). Der Isoprenylierungssequenz von hGBP1 ist ein polybasisches Cluster vorangeschaltet, welches die Affinität zu PI(4,5)P<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> stark erhöht (Heo et al., 2006). mGBP2 besitzt weder eine PH- noch eine Transmembrandomäne (predictprotein.org). Eine polybasische Sequenz fehlt ebenfalls (Abb. 4.7). Die Interaktion mit PIPs müsste demnach über die Isoprenylierungseinheit oder ein bisher nicht identifiziertes Proteinmotiv erfolgen. Für die beiden PIPs sind,



neben ihrer Präsenz in (auto)phagosomalen Membranen, Funktionen als Sekundärbotenstoffe (second messengers) bei der Regulation von Signalwegen, Transport- und zytoskelettalen Proteinen bekannt (Heo et al., 2006).

```
hGBP1 (579) QTKMRRRKACTIS (592)
mGBP2 (577) KQNKSSG-KCTIL (589)
```

**Abb. 4.7: Alignment der C-terminalen Sequenzen von hGBP1 und mGBP2.**

Die polybasische Sequenz oberhalb der Isoprenylierungsstelle von hGBP1 ist gelb unterlegt. Sie fehlt bei mGBP2.

Eine mögliche Rolle von mGBP2 im autophagosomalen Fluss wird von der Forschergruppe um Gregory Taylor diskutiert. Sie zeigen, dass in *Irgm1* oder *Irgm3* defizienten Zellen mGBP2 in intrazellulären Kompartimenten akkumuliert, die positiv sowohl für den Makroautophagie-Marker LC3 als auch für das Autophagie-Adapter-Molekül p62/Sqstm1 sind (Traver et al., 2011). Beide p47 GTPasen wurden bereits früher als Initiatoren der Autophagie in IFN- $\gamma$  induzierten Zellen diskutiert (Zhao et al., 2010). Sie sind in die Reifung von Autophagosomen und in die Fusion mit Endo-/Lysosomen involviert (Tiwari et al., 2009). In Abwesenheit von Atg5 wurde für mGBP2 eine ähnliche Lokalisation detektiert. Konfokalaufnahmen zeigen, dass in WT MEFs mGBP2 und p62 ko-lokalisieren (Verena Klümpers, persönliche Information). Eine direkte Interaktion konnte in Immunpräzipitationsexperimenten jedoch bislang nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es besteht aber auch keine direkte Wechselwirkung mit *Irgm1* oder *Irgm3*, und mGBP2 wird, im Gegensatz zu *Irga6*, nicht ubiquitinabhängig im autolysosomalen Prozess degradiert (Traver et al., 2011). So bleibt die Rolle von mGBP2 in der Autophagie bislang unklar. Kürzlich wurde gezeigt, dass mGBP7, zusammen mit mGBP1, am zellulären Transport von mono-ubiquitinierten Peptiden zu Autolysosomen partizipieren. mGBP1 bindet dabei p62-Ub, um es zu LC3-II Membranen zu transportieren. Auch mGBP1 wird bei diesem Prozess recycelt. mGBP7 liefert das Atg4b für die LC3-II abhängige Membranelongation und ist essentiell für den Abschluss des autophagosomalen Kompartiments (Kim et al., 2011). Tietzel und Kollegen beobachten für das hGBP1 ebenfalls eine Ko-Lokalisation mit LC3-positiven Kompartimenten (Tietzel et al., 2009).

Die Natur und die Zusammensetzung der vesikulären Strukturen von mGBP2 bleibt also weiterhin unklar und legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Vesikeln um GTPase spezifische Strukturen handelt, die hauptsächlich wenn nicht sogar ausschließlich

GTPasen enthalten. Die Akkumulation des Proteins in diesen Kompartimenten ist das Resultat der intrinsischen GTP-bindungsabhängigen Selbstassemblierung der Proteine und wird durch IFN- $\gamma$  induzierbare Faktoren unterstützt. Die Verankerung in membranösen Strukturen und die vesikuläre Verteilung ist jedoch zwingend gebunden an die Isoprenylierung des Proteins.

Für farnesyliertes hGBP1 wurde eine spezifische Interaktion mit Liposomen, allerdings nur in Anwesenheit von GDP·AlF<sub>x</sub> nachgewiesen (Fres et al., 2010). Im nukleotidfreien Zustand interagiert hGBP1 nicht mit Liposomen. Dieses Ergebnis korreliert gut mit Daten zu Ras Proteinen und impliziert, dass für manche Proteine die Isoprenylierung allein nicht ausreichend für eine stabile Membranassoziation ist (Bader et al., 2000; Rocks et al., 2005). Unter physiologischen Salzbedingungen hängt die Membranbindung von aktiviertem hGBP1 also von der C-terminalen Lipidmodifikation und ihrer spezifischen Konformation ab, die während der Hydrolyse entsteht (Vopel et al., 2009; Fres et al., 2010). Es wird daher postuliert, dass der C-Terminus durch die Lipidmodifikation eine Konformationsänderung erfährt, durch welche die Isoprenyleinheit innerhalb der Struktur verborgen werden könnte, ähnlich wie das von den N-terminal myristoylierten Arf Proteinen bekannt ist (Amor et al., 1994). Durch die GTP-Hydrolyse, die mit der Tetramerisierung des Proteins einhergeht, werden die Interaktionen zwischen der G- und der C-terminalen Domäne gelockert, wodurch die Isoprenylreste so ausgerichtet werden könnten, dass eine Membraninteraktion möglich wird (Prakash et al., 2000a; Praefcke et al., 2004; Ghosh et al., 2006; Vopel et al., 2009; Vopel et al., 2010). Die Membranbindung hat bei hGBP1 keinen Einfluss auf die maximale GTPase-Aktivität, verdoppelt jedoch die Dimerisierungskonstante und verändert das Produktverhältnis zugunsten von GDP (Fres et al., 2010). In welchem physiologischen Kontext das Produktverhältnis eine Rolle spielen könnte, wurde bislang noch nicht untersucht.

Die vorgenannten Beobachtungen stehen im Widerspruch zu Daten von anderen Mitgliedern der Dynaminfamilie, für die eine Steigerung der GTPase-Aktivität nach Membranassoziation beobachtet wurde (Praefcke and McMahon, 2004). Es wird daher vorgeschlagen, dass hGBP1 *in vivo* einen Zyklus aus Membranassoziation und -Dissoziation durchläuft (Fres et al., 2010). Innerhalb dieses Zyklus könnten andere Proteine involviert werden, die die Membranbindung regulieren.

mGBP2 nimmt ebenfalls einen tetrameren Übergangszustand während der GTP-Hydrolyse ein, in welchem die Geranylgeranyleinheiten möglicherweise in Richtung der

Lipidmembranen ausgerichtet werden und so eine Interaktion vermitteln können. Die Membranbindung könnte durch Interaktion mit anderen Proteinen, wie z. B. weiteren GBP Familienmitgliedern favorisiert werden. Die biologische Signifikanz einer solchen akkumulierten Prelokalisation ist zwar bislang unklar, doch die Fähigkeit einiger GBPs, unter anderem von mGBP2, und von IRGs zur parasitophoren Vakuolenmembran von *Toxoplasma gondii*-infizierten Zellen zu rekrutieren (Martens et al., 2005; Degrandi et al., 2007; Kravets et al., 2012), gibt einen Hinweis darauf, dass die GTPase-Aktivität und Membranbindung die biologische Funktion der GBPs regulieren können.

Homooligomerisierung in ringähnliche und helikale Strukturen ist essentiell für die biologische Funktion von Dynamin-ähnlichen Proteinen und ihre Aktivitäten an Membranen (McNiven, 1998; Sever et al., 2000). MxA aggregiert in Granula im Zytoplasma IFN Typ I behandelter humaner Zellen oder in Zellen, die mit dem für MxA kodierenden cDNS-Expressionskonstrukt transfiziert wurden (Pavlovic et al., 1990; Frese et al., 1995). Von diesen Granula aus rekrutieren die monomeren Proteine zu viralen Zielstrukturen, an denen sie GTP-bindungsabhängig oligomerisieren (Kochs and Haller, 1999; Janzen et al., 2000). Es wird postuliert, dass die GTP-MxA Form die interaktive Konformation darstellt, die virale Zielstrukturen erkennen kann (Kochs et al., 1998). Andererseits könnten die vesikulären Strukturen eine Art Speicherform des Proteins darstellen. Zusätzlich schützen diese Granula die MxA Proteine vor proteolytischem Abbau (Janzen et al., 2000). Ob mGBP2 helikale Strukturen ausbilden kann, ist bisher unklar. Dies könnte durch Immuno-Elektronenmikroskopie-Analysen zukünftig untersucht werden.

#### **4.3.2 Funktion von mGBP2 in der zellulären Immunabwehr gegen *T. gondii* und Verhalten der mGBP2-Mutanten**

Nach der Infektion mit *T. gondii* induzieren das angeborene und adaptive Immunsystem eine integrierte Immunantwort, die zur Resistenz gegen diesen Parasiten führt. Die angeborene Immunität hält Mechanismen bereit, die einen anfänglichen Schutz gegen die akute Phase der Infektion bieten. Für mGBPs wurde die *in vivo* Rolle bei der Abwehr gegen den Typ II ME49 *T. gondii* Stamm in C57BL/6 Mäusen gezeigt (Degrandi et al., 2007). Durch die *T. gondii* Infektion wurde die Expression von allen mGBPs stark induziert (Degrandi et al., 2007; Kresse et al., 2008). Um die Effektorfunktion von mGBPs in der Abwehr gegen *T. gondii* zu untersuchen, wurden „knockout“ Mäuse von einzelnen

mGBPs generiert. Die mGBP2 defizienten Mäuse (Dissertation C. Konermann, 2008) sind durch erhöhte Morbidität und Mortalität gekennzeichnet und weisen größere Zystenanzahlen im Gehirn auf (Degrandi et al., 2012, eingereicht). Eine ähnliche Rolle in der Abwehr gegen *T. gondii* wurde für die Mitglieder der p47 GTPasen Familie vorgeschlagen, dabei führt die Infektion mit dem Typ II ME49 Toxoplasmenstamm in Mäusen, die defizient für *Irgm1* und *Irgm3* sind, zur erhöhten Letalität (Taylor et al., 2004; Taylor, 2007).

Wie auch bei anderen parasitären Infektionen ist sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität gegen *T. gondii* vorwiegend zellvermittelt. In IFN- $\gamma$  vorstimulierten M $\Phi$  und Fibroblasten rekrutieren mGBP2 Proteinmoleküle bereits 15 min nach Infektion zur Membran, die die parasitophore Vakuole (PVM) des Parasiten umschließt (Degrandi et al., 2007; Dissertation C. Konermann, 2008 und diese Arbeit). Die molekulare Funktion dieser GTPase in der zellautonomen Abwehr ist bislang nicht bekannt. Interessanterweise akkumulieren einige Mitglieder der IRG Familie, wie *Irgm3*, *Irgm2*, *Irgb6*, *Irgd* und *Irga6* an der PVM der avirulenten *T. gondii* ME49 in IFN- $\gamma$ -stimulierten Astrozyten und gs3T3 Zellen (Collazo et al., 2001; Martens et al., 2005; Butcher et al., 2005; Hunn et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einzelner Domänen, sowie der Isoprenylierung auf die Rekrutierungseffizienz und die antiproliferative Wirkung von mGBP2 gegen den avirulenten ME49 Stamm von *T. gondii* untersucht. Hierfür wurden mGBP2 defiziente MEFs mit GFP-Fusionskonstrukten von WT mGBP2, den vorbeschriebenen Einzelpunktmutanten in den G1, G3 und G4 Motiven, den Domänen-Deletionsmutanten sowie der Isoprenylierungsmutante stabil transduziert. Die Rekrutierungsraten zu den Toxoplasmen wurden in Abhängigkeit der IFN- $\gamma$  Stimulation anhand von Ko-Lokalisationsanalysen der GTPasen mit einem *T. gondii* Protein, das in der äußeren Parasitenmembran lokalisiert (*SAG1*), am Konfokalmikroskop bestimmt. Im Vorfeld wurde festgestellt, dass die mGBP2 Defizienz weder Auswirkungen auf die Expression von benachbarten Genloci hatte, noch wurde die Rekrutierungsfähigkeit anderer mGBPs zu *T. gondii* in IFN- $\gamma$  behandelten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs beeinflusst (Degrandi et al., 2012, eingereicht, Daniel Degrandi und Sarah Lahme, persönliche Mitteilungen). Die Wahl der Zellen bei diesen Infektionsexperimenten zugunsten von MEFs gegenüber den M $\Phi$ , den eigentlichen Mediatoren der antiparasitären T<sub>H</sub>1-Antwort, wurde getroffen, um die invasiven Toxoplasmen von den phagozytierten Parasiten zu differenzieren, die sich in

den Signalwegen und zellbiologischen Mechanismen, die sie in der Wirtszelle auslösen, grundlegend unterscheiden. Die infektiösen Parasiten umgeben sich beim Eindringen in die Zelle mit einer schützenden Membran zellulären Ursprungs (PVM), die sie durch die Integration verschiedener Proteine aus sekretorischen Organellen modifizieren (Sibley, 1993). Auf diese Weise entgehen sie der lysosomalen Degradation (Fux et al., 2003), jedoch nicht der zellulären Abwehr durch GBPs, die ausschließlich zu aktiv in die Zelle eingedrungenen Erregern rekrutieren.

In IFN- $\gamma$  vorstimulierten Zellen, zwei Stunden nach *T. gondii* Infektion, ist etwa jeder zweite Parasit komplett von einer Schicht aus endogenen mGBP2 Molekülen umschlossen. Eine vergleichbare Rekrutierungsrate wurde für das rekonstituierte GFP-markierte WT Protein beobachtet, was das GFP-mGBP2 Fusionskonstrukt als eine geeignete Positivkontrolle definiert. Interessant ist, dass im Gegensatz zur vesikulären intrazellulären Lokalisation, die Rekrutierung von GFP-mGBP2 zur parasitophoren Vakuole (PV) erst nach Stimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$  erfolgt. In unstimulierten Zellen wurde hingegen keinerlei Rekrutierung des exprimierten GFP-mGBP2 zur PV beobachtet. Das bedeutet, dass mGBP2 weitere IFN- $\gamma$  induzierbare Faktoren für seine immunologische Funktion benötigt, die entweder das Protein posttranslational modifizieren (phosphorylieren, acetylieren etc.), und/oder mit ihm direkt interagieren und damit eine Konformationsänderung induzieren, die eine PVM Zielsequenz demaskiert, und/oder an dessen gezieltem Transport zum Parasiten beteiligt sind.

Keine der GTPase-Mutanten lokalisiert wie das WT Protein mit der PVM in unstimulierten Zellen. Nach IFN- $\gamma$  Stimulation korrelieren die Rekrutierungsraten der GTPase-Mutanten mit der „Schwere“ der Mutation. Die GTP-Bindungsmutanten K51A und D182N, die keine oder eine stark verringerte vesikuläre Verteilung aufweisen, sind in der PV-Assoziationsfähigkeit besonders gehemmt. Bei der K51A Mutante ist die Rekrutierungseffizienz sogar fast vollständig aufgehoben, wodurch die Bedeutung der Multimerisierung für die Rekrutierung von mGBP2 an die PVM von *T. gondii* unterstrichen wird. Die Rekrutierung von Irga6 zu *T. gondii* Vakuolen ist ebenfalls GTP-bindungsabhängig (Martens et al., 2005). Die korrespondierende K82A Mutante in Irga6 hat einen stark supprimierenden Effekt auf die *T. gondii* Resistenz und PVM Lokalisation in IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen und wirkt dominant inhibierend auf das entsprechende WT Protein (Martens et al., 2005; Hunn et al., 2008). Die „Arginin-Finger“-Mutante R48A rekrutiert nur geringfügig weniger effizient zur PVM nach IFN- $\gamma$  Stimulation als der WT,

was möglicherweise mit der Ausbildung von Heterooligomeren mit anderen IFN- $\gamma$  induzierbaren endogenen mGBP Proteinen erklärt werden könnte, welche die Komplexinstabilität dieser Mutante kompensieren könnten (Modiano et al., 2005; Britzen-Laurent et al., 2010; Virreira et al., 2011). Dagegen hat die Mutante mit dem intrinsischen Hydrolysedefekt, E99A, zwei Drittel der Rekrutierungseffizienz gegenüber dem WT eingebüßt. Daraus lässt sich schließen, dass die vesikuläre Lokalisation und die kooperative GTPase-Aktivität von mGBP2 die Effizienz der Rekrutierung erhöhen. Die hydrolytisch beeinträchtigte E99A Mutante von hGBP1 assoziiert in Anwesenheit von AlF<sub>x</sub> in IFN- $\gamma$  induzierten Zellen nicht mehr mit dem Golgi-Apparat (Modiano et al., 2005). Es könnte die Hypothese aufgestellt werden, wonach mGBP2-Multimere innerhalb der zytosolischen vesikulären Kompartimente als eine Plattform für die Assemblierung weiterer Molekülkomplexe dienen könnten, die mit mGBP2 interagieren, um die antimikrobielle Funktion zu regulieren. Gleichzeitig könnte angenommen werden, dass Konformationsänderungen im Zuge der Hydrolyse Interaktionsflächen schaffen könnten (Vopel et al., 2009), über welche weitere Effektormoleküle mit mGBP2 in Kontakt treten können.

Die IRGM Subfamilie der p47 GTPasen (Bekpen et al., 2005), zu der Irgm1, Irgm2 und Irgm3 gehören, reguliert GKS IRGs wie Irga6 und Irgb6 über die Kontrolle des GTPase-Zyklus. Die IRGMs supprimieren oder verlangsamen den spontanen Übergang von Irga6 in den aktiven GTP-gebundenen Status und erfüllen damit die Funktion von Guanin Nukleotid Dissoziationsinhibitoren (GDI) (Vetter and Wittinghofer, 2001), wodurch sie einen nukleotidabhängigen Kontakt der GMS und GKS GTPasen fördern (Hunn et al., 2008). Bei Dynamin sind assemblierungsinkompetente Mutanten, sowie einige Mutanten, die Defekte in Nukleotidbindung und Hydrolyse aufweisen, dominant negative Inhibitoren der rezeptorvermittelten Endozytose (Damke et al., 2001; Song et al., 2004a; Song et al., 2004b). Mutationen in der GTPase-Domäne von Mx, die die GTPase-Aktivität inhibieren, zerstören seine antivirale Aktivität (Pitossi et al., 1993; Ponten et al., 1997; Haller and Kochs, 2002). GTP-bindungs- und assemblierungsinkompetente Mutanten der Ras und G $\alpha$  Proteine werden mit Tumorentwicklung assoziiert (Sigal et al., 1986; Boguski and McCormick, 1993; Coleman et al., 1994; Scheffzek et al., 1997). Die Untersuchung, ob die mGBP2-GTPase-Mutanten transdominante Eigenschaften haben, wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, so dass kein Vergleich gezogen werden kann.

Die Isoprenylierungsmutante C586S von mGBP2 verliert vollständig die Fähigkeit zur PV-Rekrutierung. Die Lipidmodifikation scheint also nicht nur die Voraussetzung für die vesikuläre Lokalisation, sondern auch für die Interaktion mit der PVM zu sein. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung assoziieren die mGBP2 G- und GM-Domänen nicht mit den Parasiten. Dagegen akkumulieren alle Deletionsmutanten, die die C-terminale E-Domäne tragen (E, ME, GE) an der PVM und ihre Assoziation ist überraschenderweise IFN- $\gamma$  unabhängig. Daraus könnte man annehmen, dass im WT Protein die Erkennungssequenz für den Parasiten in der Tertiär-Struktur verborgen bzw. maskiert ist und durch die Interaktion mit den, nach IFN- $\gamma$  Stimulation exprimierten, Effektormolekülen zugänglich wird. Auf diese Weise könnte die Zelle die immunologische Funktion von mGBP2 regulieren. Im Falle der mGBP2 Trunktionsmutanten E, ME und GE ist diese Erkennungssequenz in der E-Domäne höchstwahrscheinlich frei zugänglich und kann das Protein zur PVM navigieren oder lässt eine Assoziation ohne zusätzliche Faktoren zu. Bei MxA bestimmt ebenfalls die C-terminale Region die antivirale Spezifität (Zurcher et al., 1992b). Eine Bestätigung dafür, dass die C-terminale Domäne eine Schlüsselrolle bei der Akkumulation von mGBP2 an der PV von *T. gondii* spielt, liefert das chimäre Protein bestehend aus den G- und M-Domänen von mGBP5 und der C-terminalen Region von mGBP2 (Dissertation C. Konermann, 2008). Das wahrscheinlich farnesylierte WT mGBP5 rekrutiert nicht zur PV (Degrandi et al., 2007), die mGBP5-2 Hybride ist zwar nicht mehr in den für mGBP2 typischen Vesikeln angeordnet, akkumuliert jedoch an der PV (Dissertation C. Konermann, 2008; Sarah Lahme, persönliche Information). Das reziproke mGBP2-5 Chimäre-Protein verliert ebenfalls die vesikuläre Verteilung, aber auch die Rekrutierungsfähigkeit zur PV (Dissertation C. Konermann, 2008; Degrandi et al., 2012, eingereicht). Das mGBP2 Protein mit der CaaX-Box von mGBP5 relokalisiert an die PVM von *T. gondii*, jedoch mit einer deutlich verringerten Effizienz und durch die Verknüpfung von mGBP5 mit der CaaX-Sequenz von mGBP2 (CTIL) entstand ein Protein, das zur PV rekrutieren kann, allerdings weniger effizient als das WT mGBP2 (Sarah Lahme, persönliche Information). Dies zeigt, dass neben einer spezifischen Sequenz oder eines Epitops in der E-Domäne, die Natur der Isoprenylierung bei der Assoziation mit der PVM entscheidend ist und dass für die physiologische Funktion von mGBP2 wahrscheinlich eine Geranylgeranylierung des Proteins eine Voraussetzung ist. Der Einfluss unterschiedlicher CaaX-Motive von hGBP1, 2 und 5 auf die intrazelluläre Lokalisation wurde durch Britzen-Laurent und Kollegen gezeigt (Britzen-Laurent et al., 2010). hGBP1 lokalisiert in vesikulären Strukturen, hGBP5 wird in der perinukleären

Region und am Golgi-Apparat detektiert während hGBP2 zytoplasmatisch homogen verteilt ist. Alle drei hGBPs werden am ER posttranslational modifiziert. GFP-Proteine, die C-terminal mit den entsprechenden Sequenzen CTIS (Farnesylierungssequenz), CNIL oder CVLL (Geranylgeranylierungssequenzen) konjugiert wurden, lokalisierten am Golgi-Apparat und das Konstrukt mit der polybasischen Sequenz vor dem CaaX-Motiv von hGBP1: GFP-pB-CTIS, wurde zusätzlich noch an der Plasmamembran detektiert (Britzen-Laurent et al., 2010). Damit wurde auch für humane GBPs gezeigt, dass die Prenylierung für die Assoziation der GBPs mit Membranen notwendig, aber nicht ausreichend für die Bestimmung des Zielkompartiments ist.

Bis jetzt existiert noch kein Beweis für eine direkte Interaktion von mGBP2 mit der PVM des Parasiten. Es ist möglich, dass über die Isoprenyleinheit eine Protein-Protein-Interaktion mit IFN- $\gamma$  induzierbaren Faktoren vermittelt wird (Maltese et al., 1996), die ihrerseits die PVM zum Ziel haben. Es bleibt also die grundlegende Frage offen, ob mGBP2 als molekulare Maschine physikalische Arbeit verrichtet, oder als Schalter die Aktivität von anderen Proteinen reguliert.

Unter physiologischen Bedingungen in IFN- $\gamma$  induzierten Zellen ist die mGBP2 Konzentration geschätzt etwa 30-fach höher als die Dissoziationskonstante des GTP-gebundenen Dimers (ca. 1  $\mu\text{M}$ , Cheng et al., 1985) und 15-fach höher, wenn man annimmt, dass die Isoprenylierung die Dimeraffinität ähnlich wie bei hGBP1 halbiert (Fres et al., 2010). Daher kann angenommen werden, dass mGBP2 seine volle Aktivität erreicht, wenn es innerhalb eines bestimmten zellulären Kompartiments oder an der PVM von *T. gondii* angereichert wird. Wenn der gesamte Vorrat an zellulärem mGBP2, mit der maximalen Aktivität von etwa 100  $\text{min}^{-1}$ , GTP hydrolysieren würde, könnte das zu einer lokalen oder sogar gesamtzellulären Veränderung der Nukleotid-Konzentrationen führen, was aus physiologischer Sicht die strikte Kontrolle der mGBP2 Expression erklären würde. Ein Abfall der GTP-Konzentration in der Zelle würde zuerst die Funktion der GTP-bindenden Proteine mit der schwächsten Bindung beeinträchtigen, also die der Dynamin-Familie sowie den SRP und den SR (GTP-Affinitäten von 0,39  $\mu\text{M}$  für SRP und 14  $\mu\text{M}$  für SR, Shan et al., 2009). Andererseits könnte die Funktion von mGBP2 dazu dienen durch GTPase-Aktivität GTP zu depletieren, um dadurch das essentielle Nukleotid (Schumacher et al., 2002) für den Parasiten unzugänglich zu machen und damit seinen Stoffwechsel zu unterwandern. Die GTP-Depletion könnte mit der Tryptophandepletion einhergehen, denn auch Tryptophanmangel, der durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase



(IDO) verursacht wird, wirkt inhibierend auf die *T. gondii* Replikation (Daubener et al., 2001).

Es könnte angenommen werden, dass die intrazellulären Distanzen zwischen den mGBP Kompartimenten und *T. gondii* mit Hilfe eines noch unbekanntes Transportsystems bewältigt werden. Es gibt erste Hinweise darauf, dass dieser Transport mit Hilfe des intrazellulären Zytoskeletts, genauer gesagt unter Einbeziehung von zellulären Mikrotubuli vermittelt wird, denn die Inhibition der tubulären Depolymerisierung mit Paclitaxel (Taxol®, bindet  $\beta$ -Tubulin) hat einen negativen Einfluss auf die Rekrutierungsraten (Daniel Degrandi, persönliche Information). Es ist bekannt, dass sich früh nach Invasion von *T. gondii* in Zellen drastische Umlagerungen von zellulären Mikrotubuli beobachten lassen, die zu einem vollständigen Einschließen der PV in ein Mikrotubulinetzwerk führen (Melo et al., 2001). So könnte man spekulieren, dass mGBPs die neuen tubulären Verbindungen in einer IFN- $\gamma$  abhängiger Weise nutzen, um zur PV zu gelangen. Irga6 interagiert in GTP-gebundener Form mit dem Golgi-Protein hook3 (Kaiser et al., 2004; Shenoy et al., 2007), welches an Mikrotubuli bindet und die Fusion des Salmonellen-Phagosoms mit dem Lysosom vermittelt (Shotland et al., 2003). Es wird vermutet, dass Irga6 an der Kontrolle des Transports oder an der Remodellierung dieses Organells beteiligt sein könnte (Tiwari et al., 2009). Außerdem wurde für MxA über eine Assoziation mit Aktin und Tubulin berichtet (Horisberger, 1992). Auch Dynamine partizipieren an Prozessen wie Phagozytose, Zellmotilität und Endozytose, indem sie als „kontraktile Gerüstpolymere“ an der Grenzfläche zwischen biologischen Membranen und Aktinfilamenten fungieren (Orth and McNiven, 2003).

Die Infektionskinetik über 48 Stunden hat gezeigt, dass mGBP2 in den ersten Stunden nach Infektion besonders effizient an die PVM rekrutiert und gibt einen Hinweis darauf, dass die GBPs zu den frühen zellulären Abwehrmechanismen der Zelle gegen den Parasiten zählen.

Dieses Experiment trägt ebenso zur Aufklärung der Funktion einzelner mGBP2-Domänen bei. Die Ko-Lokalisationsrate der E-Domäne-tragenden Deletionsmutanten mit der PV nimmt bereits 5 Stunden nach Infektion deutlich ab, wohingegen die Rekrutierungseffizienz des WT Proteins zu dieser Zeit ihren Höhepunkt erreicht. Daraus kann gefolgert werden, dass alle drei Domänen wichtige Funktionen bei der antiparasitären Wirkung von mGBP2 erfüllen. Verschiedene GTPasen werden in verschiedenen Phasen der Infektion benötigt. Irgm1 und Irgm3 sind während der akuten

Phase der Infektion erforderlich und Irgd spielt eine Rolle während der chronischen Infektion (Taylor et al., 2000; Collazo et al., 2001; Hunn et al., 2011; Liesenfeld et al., 2011). Die Zielsequenz für die Assoziation mit der PVM von *T. gondii* ist in der E-Domäne von mGBP2 kodiert, wohingegen die G-Domäne sowohl für die vesikuläre Verteilung von mGBP2 in uninfizierten Zellen als auch für die stabile Assoziation von mGBP2 mit der *T. gondii* PV essentiell ist. Dabei könnten sowohl Nukleotid-Bindung als auch GTP-Hydrolyse die Lokalisation von mGBP2 an der PVM verstärken und verlängern. Auf diese Weise kann für die G-Domäne von mGBP2 eine regulatorische Rolle bei der anti-mikrobiellen Effektorfunktion des Proteins postuliert werden. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung einer spontanen IFN- $\gamma$  unabhängigen Akkumulation der E-Domäne von mGBP2 an der PVM zusätzlich gestützt. Das WT mGBP2 hingegen benötigt für eine effiziente Rekrutierung die zusätzliche Stimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$ . Anhand dieser Ergebnisse lässt sich annehmen, dass innerhalb des GTPase-Zyklus die Zielsequenz für die parasitäre PV innerhalb der E-Domäne von WT mGBP2 durch die Interaktion mit IFN- $\gamma$  induzierbaren Faktoren zugänglich wird, wodurch die Assoziation mit dem Parasiten ermöglicht wird. Besonders interessant war die Beobachtung, dass 32 Stunden nach Infektion nur noch Einzelparasiten mit WT mGBP2 und, mit etwas geringerer Effizienz, mit den E-Domäne-tragenden Mutanten assoziiert sind. Für die *T. gondii* Rosetten konnte zu diesem Zeitpunkt jedoch keine Ko-Lokalisation mit mGBP2 nachgewiesen werden. Es stellt sich demnach die Frage nach der Rolle von mGBP2 bei der intrazellulären Replikation von *T. gondii*. Dabei fällt auf, dass in Zellen, die das WT mGBP2 Protein oder seine E-Domäne-tragenden Deletionsmutanten exprimieren, deutlich weniger Rosetten als in mGBP2<sup>-/-</sup> oder die mGBP2 Deletionsmutanten ohne C-Terminus exprimierenden MEFs am Konfokalmikroskop gezählt werden konnten. Dies erlaubt den Schluss, dass mGBP2 in der zellautonomen Inhibition der Toxoplasmenproliferation involviert ist. Dabei wird die Effizienz der antiparasitären Wirkung, die bereits zum Teil durch die E-Domäne vermittelt wird, durch die GTPase-Funktion erhöht. Eine andere Studie zeigt, dass die C-terminalen Helices von mGBP2 allein Effektorfunktionen vermitteln können, welche die Zellausbreitung beeinflussen (Balasubramanian et al., 2010; Vestal and Jeyaratnam, 2011). mGBP2 könnte an der PV mit anderen mGBPs interagieren und die antiparasitäre Funktion mit ihnen teilen, denn Konfokalaufnahmen zeigten eine Ko-Lokalisation von mGBP2 und mGBP1 und teilweise mGBP9 um die PV des intrazellulären Parasiten herum (Degrandi et al., 2012, eingereicht), so dass eine partielle Funktionsredundanz oder ein Synergismus zwischen den mGBP Familienmitgliedern nicht ausgeschlossen werden kann.

Leider konnte durch diese Methode nicht die absolute Zahl der intrazellulären Toxoplasmen im Verlauf der Infektion, ebenso wenig das Schicksal von mGBP2 assoziierten Parasiten ermittelt werden. Hierzu wären systematische Kinetikexperimente mit der Verfolgung von Einzelparasiten/PVs nötig.

Durch welche molekularen Mechanismen mGBP2 die Proliferation von *T. gondii* hemmt, muss noch geklärt werden. Es besteht die Hypothese für MxA Proteine, dass die Assoziation mit den viralen Zielstrukturen zur Oligomerisierung und zur Stimulation der GTPase-Aktivität führt, wodurch Konformationsänderungen induziert werden könnten, die eine antivirale Wirkung ausüben (Kochs et al., 2002). Daraus abgeleitet könnte angenommen werden, dass sich die mGBP2 Proteine innerhalb der Strukturen um die PVM herum in einer Weise konfigurieren, die die Proteine aktiviert und zur Zerstörung der Vakuolenmembran beiträgt/führt. Ein Mechanismus für die Wirkung der Mitglieder der p47 IRG Familie an der PVM von Toxoplasmen, der auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Martens et al., 2005) und Lebendzellaufnahmen in infizierten Astrozyten und MΦ (Ling et al., 2006; Zhao et al., 2009a) basiert, wurde vorgeschlagen. Die Autoren zeigen, dass auf die Assoziation von Irga6 mit dem Parasiten eine Vesikel-Abschnürung von der PVM erfolgt, dabei wird die Vakuole unter Spannung gesetzt, was an der abgekugelten Form der Vakuole in Lebendzellaufnahmen erkannt wurde, bis diese zerstört wurde. Die darauf folgenden morphologischen Veränderungen des attackierten Parasiten lassen auf seinen Tod schließen, der möglicherweise durch das zellautonome Abwehrsystem (iNOS, oxidativer Burst, anti-mikrobielle Peptide, autolysosomale Degradation etc.) vermittelt wird (Martens et al., 2005; Zhao et al., 2009a). mGBPs und IRGs gehören beide zur Familie der Dynamin-verwandten Proteine und könnten in Hinsicht auf die membranmodulierenden Funktionen ähnlich wie Dynamin fungieren. Eine direkte Interaktion zwischen IRGs und mGBPs konnte zwar in uninfizierten Zellen bislang nicht detektiert werden (Traver et al., 2011), diese wäre aber an der PV des Parasiten denkbar. So könnten Vertreter dieser beiden Familien, die zur *T. gondii* PV rekrutieren, an der Zerstörung der PVM zusammenwirken.

Rückkehrend zur Infektionskinetik, könnte eine, unter anderem durch mGBP2 vermittelte Toxoplasmeneliminierung eventuell die Frage beantworten, warum bereits nach 24 Stunden deutlich weniger mGBP2 positive Toxoplasmen PVs gezählt werden konnten. Eine andere Erklärung könnte die durch *T. gondii* im Verlauf der Infektion inhibierte STAT1-vermittelte Gentranskription in IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen über die

Induktion von SOCS Proteinen (Zimmermann et al., 2006; Murray, 2007) liefern, die das IFN- $\gamma$  Signalling blockieren und damit den GBPs die Faktoren entziehen könnten, die sie für die Rekrutierung benötigen. Für die E-Domäne tragenden Mutanten, die IFN- $\gamma$  unabhängig an der PV assoziieren können, dürfte dieser Mechanismus keine Rolle spielen. Zur Aufklärung dieser Phänomene könnte metabolisches Labelling mit der Bestimmung der Lebensdauer von mGBP2 durchgeführt werden.

Irgm3- und Irgm1-defiziente Mäuse sind empfindlich gegen die Infektion mit *L. major*. Sie entwickeln Läsionen und weisen sogar eine höhere Parasitenlast als IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tiere auf, was ihre Funktion bei der Resistenz gegen vakuolenresidente Protozoa unterstreicht. Für mGBP2 könnte ebenfalls angenommen werden, dass seine Funktion in der Abwehr intrazellulärer membranumschlossener Pathogene liegt, denn eine Rolle in der *L. monocytogenes* Infektion konnte bislang noch nicht gezeigt werden (Degrandi et al., 2012, eingereicht). Die Bakterien, ähnlich wie *T. cruzi* lysieren das Phagosom und entkommen ins Zytosol kurz nach dem Eindringen (MacMicking et al., 2003; Cossart, 2011). Sie sind dann nicht mehr in Membranstrukturen eingeschlossen, an die mGBP2 binden könnte. Die Suszeptibilität von IRF-1<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber *L. monocytogenes* (Degrandi et al., 2012, eingereicht) lässt aber vermuten, dass andere mGBPs möglicherweise auch ohne direkten Kontakt eine anti-mikrobielle Wirkung ausüben könnten, wie das von GMS IRGs in *T. gondii* Infektion bekannt ist (Hunn and Howard, 2010).

Mehrere Studien zeigen, dass die autolysosomale Degradation, unter der Beteiligung von IRG Proteinen, einen wichtigen Mechanismus der Infektionskontrolle von *T. gondii* darstellt (Subauste, 2009; Hunn et al., 2011). Diese Arbeit liefert erste Hinweise darauf, dass die mGBP2 positiven Toxoplasmen Autophagie-abhängig degradiert werden. Ein indirektes Indiz dafür bietet die Bindung von mGBP2 an PIP Lipide phagosomalen und autophagosomalen Ursprungs sowie eine partielle Ko-Lokalisation mit autophagosomalen Strukturen. Außerdem wurden in Lebendzellaufnahmen vesikuläre Strukturen von mGBP2 unmittelbar an der Plasmamembran der MEFs beobachtet (s. Anhang, Abb. E, Abb. F). Die Autophagosomen sind besonders massiv um intrazelluläre Toxoplasmen akkumuliert, deren PV nicht mehr intakt zu sein scheint, was durch einen durchbrochenen mGBP2-Ring in der konfokalen Mikroskopie erkennbar ist. So könnte spekuliert werden, dass mGBP2 am Transport von ubiquitinierten Peptiden vom Toxoplasmenkompartiment zu Autolysosomen über die Interaktion mit dem

autophagosomalen Adapter Protein p62 involviert ist (Kim et al., 2011; Traver et al., 2011, Verena Klümpers, persönliche Information). Die definitive Funktion von mGBP2 in diesem Prozess bleibt jedoch momentan noch unklar.

In diesem Kontext könnte die Tatsache von Interesse sein, dass von *T. gondii* sekretierte hydrophobe GRA Proteine (GRA2 bis GRA9) mit Liposomen interagieren können (Coppens et al., 2006). Dabei könnte GRA7, welches an der Verankerung der Mikrotubuli der Wirtszelle in der PVM mitwirkt und auf diese Weise die Vernetzung des Parasiten mit endo/lysosomalen Kompartimenten vermittelt (Coppens et al., 2006), mit negativ geladenen Lipiden, darunter PIP Lipiden wie PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> interagieren. So könnte spekuliert werden, dass mGBP2 über eine GRA Protein-vermittelte Assoziation an Lipide des endo/lysosomalen Kompartiments mit *T. gondii* in Kontakt tritt und möglicherweise die Ausbeutung dieser Organellen durch den Parasiten unterbindet.

Die aktuellen Hypothesen schlagen vor, dass IRGs in die Modulation der Membranprozessierung der Zellen involviert sind (Martens et al., 2005; Butcher et al., 2005), welche das Überleben von intrazellulären Pathogenen beeinflusst (Taylor et al., 2004). Ling und Kollegen berichten über die Lysosom-vermittelte Degradation von *T. gondii* in aktivierten MΦ *in vivo*. Dabei ist die Eliminierung der Toxoplasmen abhängig von der p47 GTPase Irgm1, die an Prozessen der PV Vesikulierung und Degradation des Parasiten beteiligt ist. Dazu benötigt Irgm1 die PI 3-Kinase Aktivität, die für die Ausbildung von Autophagosomen essentiell ist (Tiwari et al., 2009). Die „denudierten“ Toxoplasmen werden in autophagosomähnlichen Vesikeln eingeschlossen, die mit Lysosomen fusionieren (Ling et al., 2006). Interessanterweise bleibt Irgm1 mit autophagosomähnlichen Strukturen assoziiert, die die Parasiten enthalten. Möglicherweise ist die lysosomale Degradation von *T. gondii* ein zellspezifischer Vorgang, der in MΦ, als den wichtigsten Effektorzellen bei einer Toxoplasmeninfektion, verstärkt stattfindet, in anderen Zellen, wie Astrozyten und MEFs jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielt (Martens et al., 2005; Dissertation C. Konermann, 2008).

Außerdem wurde beschrieben, dass Irgm1 in MΦ zu den phagosomalen Nischen von *M. tuberculosis* (*Mtb*) transloziert (MacMicking et al., 2003) und dass Irgm1 an das mykobakterielle Phagosom über Interaktionen mit PI(3,4)P<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> bindet (Tiwari et al., 2009). Durch diese Lipidassoziation und die Interaktion mit der PI 3-Kinase wird die GTPase-Aktivität über eine allosterische Schaltung stimuliert, wodurch Irgm1 besser an ein fusogenes Effektormolekül (Snapin) binden kann und damit die Fusion des Phagosoms

mit dem Lysosom über die Ausbildung des SNARE-Komplexes beschleunigt (Tiwari et al., 2009). Außerdem ist Irgm1, ähnlich den Rab GTPasen, an Zytokin-abhängigen Reifungsprozessen des Phagosoms beteiligt und fördert die Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie (MacMicking et al., 2003; Gutierrez et al., 2004).

mGBPs scheinen bei der Abwehr gegen Mykobakterien eine Rolle zu spielen (Kim et al., 2011). mGBP5 wurde mit *Mtb* Phagosomen gereinigt, mit denen das Protein wahrscheinlich über die PIP Lipide assoziiert (Sarah Lahme, persönliche Information), es verfügt hierfür sowohl über eine Farnesylierung als auch über die polybasische Sequenz (<sup>579</sup>HHRRHHH<sup>585</sup>). mGBP1 defiziente Mäuse weisen, trotz der intakten IFN- $\gamma$  Produktion, eine deutlich höhere Bakterienlast auf (Kim et al., 2011). mGBP1 und mGBP7 rekrutieren zu mykobakteriellen Vakuolen (Kim et al., 2011), ähnlich wie das für die *T. gondii* PV beobachtet wurde (Degrandi et al., 2007). Es wird vorgeschlagen, dass sie dabei antimikrobielle Effektormoleküle zum Kompartiment des Pathogens transportieren, wie die Komponenten des Phox-Komplexes, der das Superoxidanion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) für die Abtötung von intrazellulären Erregern generiert. mGBP7 interagiert dabei direkt mit den Untereinheiten von Phox und ist an deren Assemblierung zum Enzymkomplex beteiligt (Kim et al., 2011). Nichtsdestotrotz, eine essentielle Rolle für ROI, die durch den Phox-Komplex generiert werden, konnte bislang für die Kontrolle der *T. gondii* Infektion nicht gezeigt werden (Halonen and Weiss, 2000).

Neueste Studien zeigen, dass auch humane GBPs bei der mikrobiellen Abwehr eine Rolle spielen. hGBP1 und hGBP2 potenzieren den IFN- $\gamma$  Effekt bei der zellulären Resistenz gegen *Chlamydia trachomatis*. Für die Lokalisation von hGBP1 an der Einschlussmembran des Bakteriums reicht die isoprenylierte C-terminale Domäne aus. Die antibakterielle Wirkung ist antiproliferativ und bedarf einer funktionellen GTP-Bindedomäne, denn sowohl die wenig aktive dominant negative D184N Mutante von hGBP1 als auch die GTPase-Domäne deletierte Mutante kann das Chlamydienwachstum nicht inhibieren (Tietzel et al., 2009). Anders als bei mGBP2 bei der *T. gondii* Infektion wurde dieser wachstumshemmende Effekt auch ohne IFN- $\gamma$  beobachtet, konnte jedoch nach IFN- $\gamma$  Stimulation um ein Vielfaches verstärkt werden. Die eigentliche Funktion an der Einschlussmembran von *C. trachomatis* ist nicht bekannt, diese könnte aber darin bestehen, die Bakterienkompartimente für die Fusion mit Autophagosomen zu markieren. Einen Hinweis darauf liefern Studien, in denen für hGBP1 eine Ko-Lokalisation mit LC3-positiven Kompartimenten detektiert wurde (Tietzel et al., 2009). mGBP2 ko-lokalisiert

jedoch nicht mit *Chlamydia pneumoniae* (Dissertation C. Konermann, 2008), was allerdings nicht ausschließt, dass diese GTPase einen Effekt gegen Chlamydien ausübt. Alternativ könnte auch diskutiert werden, dass *C. pneumoniae* über Mechanismen verfügt, die Rekrutierung von mGBPs zu antagonisieren, wie das beim virulenten BK Stamm von *T. gondii* gezeigt werden konnte (Degrandi et al., 2007). Dennoch wird bereits vorgeschlagen, dass die GBPs Zielproteine von virulenten Faktoren von Chlamydien sein könnten und dass diese Zytotoxine möglicherweise die Bindung von GBPs an die Einschussmembran über die Hemmung der GTPase-Aktivität inhibieren (Nelson et al., 2005). Für die IRG Proteine Irgb10 und Irga6 wird vermutet, dass ihre Lokalisation an der Chlamydien PV durch den Toxingehalt reguliert wird. Chlamydien rufen, ähnlich wie die Toxoplasmen, eine  $T_H1$  Antwort des befallenen Wirts hervor, und werden auch am effektivsten durch  $IFN-\gamma$  eliminiert (Perry et al., 1999).

mGBPs und IRGs können zu virulenten *T. gondii* Stämmen vom Typ I nur eingeschränkt rekrutieren (Degrandi et al., 2007; Zhao et al., 2009a; Steinfeldt et al., 2010). Die Stämme haben durch Polymorphismen in bestimmten Genloci Strategien entwickelt den zellulären Abwehrmechanismen zu entkommen. Steinfeldt und Kollegen konnten zeigen, dass mehrere IRG Proteine, darunter Irga6 Zielmoleküle der ROP18 Kinase Aktivität sind, die durch Phosphorylierung in der Switch I Region inaktiviert werden und nach dieser Modifikation die Zellen vor der parasitären Replikation nicht mehr schützen können (Steinfeldt et al., 2010). Kürzlich wurde gezeigt, dass die ROP18 vermittelte Phosphorylierung der IRGs an der PVM durch die vorangehende ROP5 vermittelte Arretierung der IRGs im monomeren GDP-gebundenen Zustand unterstützt wird. Dadurch wird die Oligomerisierung der IRGs an der PVM inhibiert (Fleckenstein et al., 2012). Aber auch andere Rhoprienproteine wie ROP16, das STAT3 aktiviert und damit die IL-12 Produktion unterdrückt und die ROP5 Pseudokinasen, die für die Virulenzunterschiede zwischen verschiedenen *T. gondii* Stämmen verantwortlich sind (Saeij et al., 2006; Yamamoto et al., 2009), stellen Immun-Evasionsmechanismen von *T. gondii* dar. Kürzlich wurde das „dense granule“ Protein GRA15 als ein Virulenzfaktor identifiziert, der *T. gondii* stammspezifisch die Akkumulationseffizienz von mGBP1 an der PV reguliert (Virreira et al., 2011).

Der antiproliferative Effekt von mGBP2 auf zellulärer Ebene könnte in einer verringerten Infektiosität des Parasiten resultieren, wodurch die morphologische Umschaltung von der akuten Form des Tachyzoiten zur chronischen Form des Bradyzoiten initiiert wird

(Sibley, 1993). Das Fehlen dieser proliferationsinhibitorischen Wirkung in mGBP2 defizienten Mäuse könnte ein Grund für die erhöhte Mortalität der Tiere und für die höhere Zysten Zahlen im Gehirn sein (Degrandi et al., 2012, eingereicht).

### 4.3.3 Interaktionspartner von mGBP2

Konfokale Analysen der Ko-Expressionsstudien mit transfizierten GFP-mGBP Fusionskonstrukten und gleichzeitiger endogener Anfärbung einer weiteren GTPase zeigen, dass mGBP1, 2 und 3 miteinander ko-lokalisieren und sich in denselben vesikulären Kompartimenten befinden (Dissertation C. Konermann, 2008). Eine partielle Ko-Lokalisation von mGBP2 und mGBP5 konnte besonders in der perinukleären Region ebenfalls detektiert werden. In Interaktionsstudien unter der Anwendung der Ko-Immunpräzipitationstechnik konnte eine direkte Wechselwirkung zwischen mGBP2 und mGBP1, mGBP3 und mGBP5 (mit beiden Isoformen) nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die *in vivo* Homomultimerisierung von mGBP2 Molekülen in HA- und FLAG-mGBP2 überexprimierenden NIH 3T3 Fibroblasten und in mit GFP-mGBP2 transduzierten WT MEFs verifiziert werden. mGBP7 wird in MEFs nur sehr schwach exprimiert, so dass eine eindeutige Aussage über eine direkte Interaktion mit mGBP2 nicht getroffen werden kann.

Die „Yeast-two-Hybrid“ (Y2H) Analyse, die in Zusammenarbeit mit Dr. Julia Hunn aus dem Institut für Genetik an der Universität zu Köln durchgeführt wurde, brachte vergleichbare Ergebnisse. Es wurden Interaktionen von mGBP1 bis mGBP5, mGBP8, 9 und 10 untereinander ausgetestet. Die primären Daten korrelieren zum Teil mit den Ergebnissen der Immunpräzipitation. Im Gegensatz zu den Ko-Immunpräzipitationsexperimenten spiegeln sie die Interaktion zwischen mGBP2 und mGBP1 aber nicht wieder (Abb. 4.8).



AD\BD-	mGBP-1	mGBP-2	mGBP-3	mGBP-4	mGBP-5	mGBP-8	mGBP-9	mGBP-10	empty
mGBP-1	--	--	--	--	--	--	--	--	--
mGBP-2	--	+	+	--	+	--	--	--	--
mGBP-3	--	+	+	--	+	--	+	--	--
mGBP-4	--	--	--	--	--	--	--	--	--
mGBP-5	--	+	+	--	+	--	--	--	--
mGBP-8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
mGBP-9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
mGBP-10	--	--	+	--	+	--	+	+	--
empty	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Selektion mit hoher Strengenz Tag 1-3

Selektion mit hoher Strengenz Tag 4-7

Selektion mit mittlerer Strengenz

Selektion mit niedriger Strengenz

**Abb. 4.8: Y2H-Analyse der Interaktionen von mGBPs.**

Persönliche Information von Dr. Julia. Hunn aus dem Institut für Genetik an der Universität Köln.

Damit ist erwiesen, dass mGBP2 mit bestimmten GBPs in denselben Kompartimenten lokalisiert und darüber hinaus einen direkten Bindungspartner darstellt. Mit Hilfe der Ko-Immunitätspräzipitation, der Y2H-Analyse und der Konfokalmikroskopie konnte für hGBPs eine Homo- und Heterodimerisierung *in vivo* gezeigt werden (Britzen-Laurent et al., 2010). Dadurch dirigierten die prenylierten GBPs (hGBP1, 2 und 5) in einer hierarchischen Art und Weise andere GBPs zu ihren subzellulären Kompartimenten. So rekrutiert hGBP1 hGBP2 und hGBP5, und hGBP5 bestimmt die Position von hGBP2. Die Lokalisation von nicht-prenylierten hGBPs wurde ebenfalls durch die Proteine hGBP1, 2 und 5 festgelegt (Britzen-Laurent et al., 2010). Auf diese Weise bestimmt die Heterodimerisierung die subzelluläre Lokalisation der hGBPs.

Das Vorfinden von mGBP1 und mGBP2 in denselben zellulären Kompartimenten könnte daher aufgrund der Rekrutierung einer GTPase durch die andere über Heterodimerisierung erfolgen. Die Proteine sind hoch homolog (>80% Identität in der Aminosäuresequenz), beide weisen ein Geranylgeranylierungsmotiv auf (Vestal et al., 2000; Stickney and Buss, 2000) und könnten über diese Lipidmodifikation an Membranen binden. Hierfür müsste das gemischte Di-/Tetramer die GTPase-Aktivität stimulieren können. Daher sollten die katalytischen Eigenschaften sowohl von mGBP1 als auch eines Gemisches dieser beiden GTPasen untersucht werden. Die entsprechenden Plasmide für eine rekombinante Expression wurden bereits konstruiert und die Expression des Proteins durch die Induktion mit IPTG positiv getestet (Elisabeth Kravets, Daten nicht gezeigt). Dabei wird immer noch die Frage offen bleiben, welche von den beiden GTPasen hierarchisch der anderen übergeordnet ist und welche sequenziellen, strukturellen oder

funktionalen Eigenschaften dafür verantwortlich sind. Da aber bekannt ist, dass mGBP1 *in vivo* nicht vollständig geranylgeranyliert wird (Stickney and Buss, 2000), ist es wahrscheinlich, dass die leitende Rolle mGBP2 zufallen sollte. mGBP2 interagiert ferner mit mGBP3. mGBP3 besitzt jedoch keine Isoprenylierungssequenz. Folgt man der Argumentation für hGBPs, könnte mGBP2 die Position von mGBP3 bestimmen und die GTPase in das vesikuläre Kompartiment dirigieren. In diesem Zusammenhang müsste die GTPase-Aktivität und Oligomerisierungsfähigkeit von mGBP3 analysiert werden. Interessant ist, dass sowohl mGBP1 als auch mGBP3 mit mGBP2 eine hohe Sequenzhomologie aufweisen (Boehm et al., 1998; Kresse et al., 2008), die möglicherweise bei der Heterodimerisierung und auch bei der Bestimmung der intrazellulären Hierarchie eine Rolle spielt. mGBP5 und mGBP2 sind dagegen deutlich weniger homolog (Kresse et al., 2008). Dies könnte möglicherweise trotz direkter Interaktion auf einen geringen gegenseitigen Einfluss bei der intrazellulären Lokalisation schließen lassen. Bei den IRG Proteinen kommt der Regulation der GKS GTPasen durch die GMS Subfamilie eine wichtige Rolle zu. Die letzteren beeinflussen den Nukleotid-Bindungsstatus von Irga6 und Irgb6 und kontrollieren dadurch sowohl deren intrazelluläre Lokalisation als auch die Akkumulation an der PVM von *T. gondii*, in dem sie die spontane GTP-abhängige Aktivierung der GKS Proteine verhindern (Hunn et al., 2008).

Die Ausbildung von intrazellulären Interaktionen zwischen mGBPs und einer gegenseitigen Kompartimentierung könnte der Regulation und der immunologischen Flexibilität in der Abwehr verschiedener Pathogene dienen. Zwar rekrutieren mGBP1 und mGBP2 in Abwesenheit von mGBP5 zur PV (Sarah Lahme, persönliche Mitteilung), ob jedoch das Fehlen von mGBP5 die PVM-Rekrutierungsrate beeinflusst, muss noch quantifiziert werden.

## 4.4 Ausblick

Die Aufklärung der Kristallstrukturen von mGBP2 im nukleotidfreien und nukleotidgebundenen Zustand würde detaillierte Informationen über die Konformationsänderungen des Proteins während des Reaktionszyklus und die daran beteiligten Aminosäuren liefern. Von besonderem Interesse wäre dabei eine Struktur des Proteins im tetrameren Komplex mit GDP und  $AlF_x$ , um die Aktivierung der Hydrolyse durch die Oligomerisierung auf molekularer Ebene zu verstehen. Die Untersuchung der Deletionsmutanten einzelner Domänen von mGBP2 würde die Rolle der beiden helikalen Domänen bei der Hydrolyse von GTP über GDP zu GMP zeigen. Für das Verständnis des katalytischen Mechanismus wären auch die biochemische Charakterisierung von direkten Interaktionspartnern von mGBP2, nämlich mGBP1, 3 und 5, sowie die Aufklärung ihrer Strukturen hilfreich. Dabei sollte auch die Frage aufgenommen werden, ob sich die verschiedenen mGBPs gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen. Protein-Protein Interaktionen unter physiologischen Bedingungen könnten mit Hilfe der Kombination aus „atomic force microscopy“, „surface plasmon resonance“ und „quartz crystal microbalance“ sowie von MFIS mit besonderem Augenmerk auf Orientierung der Proteine, kinetischen Aspekte und Konformationsänderungen analysiert werden (Weidtkamp-Peters et al., 2009; Kerstan et al., 2010). Der Einfluss der C-terminalen Lipidmodifikation von mGBP2 auf die GTPase-Aktivität, Oligomerisierung und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen wird von großem Interesse sein und könnte mit Hilfe von *in vitro* Geranylgeranylierungstechniken überprüft werden (Fres et al., 2010).

Um die Rolle von mGBP2 bei der Infektionsabwehr zu untermauern, wären weitere Infektionsmodelle mit intrazellulären Erregern interessant. Dabei sollten Parameter wie Pathogenlast und Zytokinexpression in mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen mit wildtypischen Tieren verglichen werden. Die Identifikation von weiteren Proteinen, die mit mGBP2 interagieren, kann einen wichtigen Hinweis auf die biologische Funktion von mGBP2 als Teil der zellulären Antwort auf IFN- $\gamma$  Stimulation liefern. Dabei könnte es sich um IFN-induzierte, zelluläre Proteine, aber auch um Proteine der intrazellulären Pathogene handeln. Die Interaktionspartner könnten in Immunpräzipitationsexperimenten unter verbesserten Bedingungen und anschließender Massenspektrometrie ermittelt werden. Von besonderem Interesse wäre die Aufklärung der molekularen Funktion von mGBP2 an der PVM von *T. gondii*. Elektronenmikroskopische Analysen und Untersuchungen von

Protein-Membran Interaktionen anhand der Änderung des Membranpotentials in einem artifiziellen System könnten eine direkte Assoziation von mGBPs mit der PV der Toxoplasmen überprüfen. Kinetische Verlaufsbeobachtungen mit lebenden Zellen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop könnten klären, ob mGBP positive Vakuolen während der Infektion zerstört werden. Anisotropie basierte homo-FRET Analysen an den PVMs von GFP-mGBP2 exprimierenden, mit *T. gondii* infizierten Zellen könnten außerdem Hinweise auf die Art der Assemblierung der Proteine an der PV von Parasiten geben und klären ob sich diese von den multimeren Strukturen innerhalb der mGBP2 Kompartimente unterscheidet. Kürzlich generierte Mäuse mit multiplen mGBP Defizienzen sollten es ermöglichen, die individuelle und kooperative Rolle der mGBPs in der *T. gondii* Infektion zu bestimmen (Yamamoto et al., 2012).

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die biochemische und immunologische Charakterisierung des IFN- $\gamma$  induzierten murinen Guanylat-bindenden Proteins 2 (mGBP2). Mit Hilfe von GTPase-Mutanten wurden Erkenntnisse gewonnen, die zum Verständnis der Prozesse der Nukleotidbindung und Oligomerisierung und zur Aufklärung vom Mechanismus der Hydrolyse von GTP zu GMP beitragen. Die biochemischen Eigenschaften von mGBP2 bilden den Rahmen, in dem es seine biologische Funktion im zellautonomen Abwehrsystem gegen Pathogene ausüben kann. Dabei konnte im Rahmen dieser Arbeit die Funktion einzelner Domänen und der Isoprenylierung für die subzelluläre Lokalisation und für die immunologische Funktion bei der *T. gondii* Infektion aufgeklärt werden.

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mGBP2 Fluoreszenz-markierte Guanin-Nukleotide mit Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich bindet, wobei die Affinitäten zum GTP-Analogon mant-GTP $\gamma$ S, sowie mant-GDP 30-fach höher sind als für mant-GMP. Unter physiologischen Bedingungen liegt das Protein daher überwiegend im GTP-gebundenen Zustand vor und der Nukleotidaustausch kann unabhängig von Austauschfaktoren erfolgen. Die Aminosäuren K51 und D182 in der P-Schleife bzw. dem G4 Nukleotid-Bindemotiv von mGBP2 partizipieren direkt an der Nukleotidbindung, wobei die Letztere vermutlich für die spezifische Erkennung der Guaninnukleotide verantwortlich ist. Ein Austausch dieser Aminosäuren resultiert in mutierten Proteinen K51A bzw. D182N mit deutlich verringerten Nukleotid-Bindungs Kapazitäten.

Die Hydrolyse von GTP durch mGBP2 erfolgt unter konsekutiver Abspaltung der  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphate unter Bildung eines GDP-gebundenen Intermediats und resultiert in der Produktion sowohl von GDP als auch von GMP, wobei bei 37°C GMP das Hauptprodukt ist. Ein Indiz für die Sukzessivität der beiden Hydrolyseschritte ist die Unfähigkeit von mGBP2 aus der Lösung gebundenes GDP zu GMP umzusetzen. Die GTP-Hydrolyse von mGBP2 ist kooperativ und die spezifische Aktivität ist abhängig von der Proteinkonzentration. Dieses kooperative Verhalten beruht auf einer nukleotidabhängigen Oligomerisierung der mGBP2-Moleküle. Größenausschlusschromatographische Experimente zeigen, dass das mGBP2 Protein im GTP $\gamma$ S- und GDP-gebundenen Zustand Dimere bildet und im Komplex mit GDP und Aluminiumfluorid, welcher den Übergangszustand der Hydrolysereaktion nachahmt,

weiter zu Tetrameren assembliert. Die Aminosäure E99 in der Switch II Region von mGBP2 ist in die Hydrolyse-reaktion involviert und ihre Mutation führt, wahrscheinlich durch die Inhibition der Flexibilität der Switch II Region, zur verringerten Aktivität und GMP-Produktion. Das konservierte Arginin in der P-Schleife von mGBP2 erfüllt die Funktion des „Arginin-Fingers“ und stabilisiert das, während der Hydrolyse-reaktion entstehende, Oligomer. Die Mutation der Isoprenylierungsstelle von mGBP2 hat in dem verwendeten System keinen Einfluss auf die Nukleotid-Bindung bzw. Hydrolyse von GTP.

Die funktionale Analyse des endogenen mGBP2 Proteins in murinen embryonalen Fibroblasten, sowie des wildtypischen GFP-Fusionsproteins in rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen zeigt, dass mGBP2 nach IFN- $\gamma$  Stimulation in vesikelartigen Strukturen im Zytosol lokalisiert vorliegt. Anhand der GFP-Fusionsproteine der GTPase-Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass diese Verteilung sowohl der GTPase-Aktivität als auch der Isoprenylierung bedarf und durch IFN- $\gamma$  induzierbare Faktoren verstärkt wird.

Die Analyse der Replikation des Typ II *T. gondii* Stammes ME49 zeigte, dass mGBP2 die Proliferation des Parasiten attenuiert und dadurch wahrscheinlich dessen Ausbreitung verhindert. Das Protein rekrutiert IFN- $\gamma$  abhängig zur parasitophoren Vakuole (PV) von *T. gondii*. Die Zielsequenz für die Rekrutierung zur PV und die Kontrolle über die parasitäre Replikation ist in der C-terminalen E-Domäne von mGBP2 kodiert. Die Lipidmodifikation des Proteins ist erforderlich sowohl für die vesikuläre Verteilung als auch für die Interaktion mit dem Erreger. Die GTPase-Aktivität erhöht die Effizienz der Rekrutierung in der frühen Phase der Infektion und vermittelt dessen anhaltende Effektorfunktion an der PV des Parasiten.

mGBP2 geht Interaktionen mit anderen mGBP Proteinen ein. Dadurch könnten GTPase-Aktivität, subzelluläre Lokalisation und immunologische Spezifität und Variabilität der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene reguliert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die GTPase Aktivität und die subzelluläre Lokalisation in vesikulären Strukturen Voraussetzungen für eine anti-mikrobielle Effektorfunktion von mGBP2 bei der Abwehr von *T. gondii* Infektion darstellen.

## 6 Summary

The aim of this study was the biochemical and immunological characterization of IFN- $\gamma$  inducible murine guanylate-binding protein 2 (mGBP2). By means of GTPase mutants, insights were gained into the processes of nucleotide binding, oligomerization and into the mechanism of hydrolysis of GTP to GMP. The biochemical properties of mGBP2 provide a framework within which it exerts its biological function in cell-autonomous defense system against pathogens. This study determines the function of individual domains and the isoprenylation of mGBP2 for the subcellular localization and immunological function in *T. gondii* infection.

The experimental results of this study show that mGBP2 binds fluorescence-labeled guanine nucleotides with dissociation constants in the micromolar range, while the affinities for the GTP analog mant-GTP $\gamma$ S and mant-GDP are 30-fold higher than for mant-GMP. Under physiological conditions, the protein is therefore predominantly present in the GTP-bound state and the nucleotide exchange can take place independently of exchange factors. The amino acids K51 and D182 in the P-loop and the G4 nucleotide binding motif of mGBP2 participate directly in the nucleotide binding, while the latter one could be responsible for the specific recognition of guanine nucleotides. An exchange of these amino acids results in mutant proteins K51A and D182N with significantly reduced nucleotide-binding capacity.

During hydrolysis of GTP mGBP2 cleaves the  $\gamma$ - and  $\beta$ -phosphates in a consecutive manner forming a GDP-bound intermediate. The reaction results in the production of both GDP and GMP, with GMP as the main product at 37°C. One indication of the successiveness of the two hydrolysis steps is the inability of mGBP2 to convert solution bound GDP to GMP. The GTP hydrolysis by mGBP2 is cooperative and the specific activity depends on the protein concentration. This cooperative behavior is stimulated by the nucleotide dependent oligomerization of the mGBP2 molecules. Size exclusion chromatography experiments indicate that the protein forms dimers in the GTP $\gamma$ S- and GDP-bound state and further assembles to tetramers in complex with GDP and aluminum fluoride, which mimics the transition state of hydrolysis. The amino acid E99 in the switch II region of mGBP2 is involved in the hydrolysis reaction and its mutation leads to reduced activity and GMP production, probably by inhibiting the flexibility of the switch II region. The conserved arginine in the P-loop of mGBP2 fulfills the function of the

"arginine finger" and stabilizes the oligomeric structure during the hydrolysis reaction. In the system used the mutation of the isoprenylation site of mGBP2 has no influence on nucleotide binding or hydrolysis of GTP.

The functional analysis of the endogenous mGBP2 in murine embryonic fibroblasts, as well as of the wild-type GFP-fusion protein in reconstituted mGBP2<sup>-/-</sup> cells shows that after IFN- $\gamma$  stimulation mGBP2 localizes in vesicle-like structures in the cytosol. Using the GFP-fusion proteins of the GTPase mutants it could be shown that this distribution requires both the GTPase activity and the isoprenylation and is enhanced by IFN- $\gamma$  inducible factors.

The analysis of replication of *T. gondii* type II strain ME49 revealed that mGBP2 attenuates the proliferation of the parasite, thereby probably preventing its spread. The protein recruits to the parasitophorous vacuole of *T. gondii* (PV) in an IFN- $\gamma$  dependent manner. The target sequence for the recruitment to the PV and for the control over the parasitic replication is encoded in the C-terminal E-domain of mGBP2. The lipid modification of the protein is required for the vesicular distribution as well as for the interaction with the pathogen. The GTPase activity increases the efficiency of recruitment in the early phase of infection and mediates its ongoing effector function at the PV of the parasite.

mGBP2 interacts with other mGBP proteins. These interactions could regulate the GTPase activity, subcellular localization and immunological specificity and variability of the defense against intracellular pathogens.

In summary, it was shown that the GTPase activity and the subcellular localization in vesicular structures are prerequisites for an anti-microbial effector function of mGBP2 in defense against *T. gondii* infection.



## 7 Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and von Saunders, S. P. Cellular and Molecular Immunology. 2007.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Abdullah, N., Balakumari, M., and Sau, A. K. (2010). Dimerization and its role in GMP formation by human guanylate binding proteins. *Biophys. J.* *99*, 2235-2244.

Abdullah, N., Srinivasan, B., Modiano, N., Cresswell, P., and Sau, A. K. (2009). Role of individual domains and identification of internal gap in human guanylate binding protein-1. *J. Mol. Biol.* *386*, 690-703.

Accola, M. A., Huang, B., Al Masri, A., and McNiven, M. A. (2002). The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *277*, 21829-21835.

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

Aebi, M., Fah, J., Hurt, N., Samuel, C. E., Thomis, D., Bazzigher, L., Pavlovic, J., Haller, O., and Staeheli, P. (1989). cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol. Cell Biol.* *9*, 5062-5072.

Ahmadian, M. R., Kiel, C., Stege, P., and Scheffzek, K. (2003). Structural fingerprints of the Ras-GTPase activating proteins neurofibromin and p120GAP. *J. Mol. Biol.* *329*, 699-710.

Ahmadian, M. R., Stege, P., Scheffzek, K., and Wittinghofer, A. (1997). Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat. Struct. Biol.* *4*, 686-689.

Ahmadian, M. R., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2002). Fluorescence methods in the study of small GTP-binding proteins. *Methods Mol. Biol.* *189*, 45-63.

Ajioka, J. W., Fitzpatrick, J. M., and Reitter, C. P. (2001). *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert. Rev. Mol. Med.* *2001*, 1-19.

Ajzenberg, D., Banuls, A. L., Su, C., Dumetre, A., Demar, M., Carme, B., and Darde, M. L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* *34*, 1185-1196.

Albermann, C., Ghanegaonkar, S., Lemuth, K., Vallon, T., Reuss, M., Armbruster, W., and Sprenger, G. A. (2008). Biosynthesis of the vitamin E compound delta-tocotrienol in recombinant *Escherichia coli* cells. *Chembiochem.* *9*, 2524-2533.

Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., and Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS. Pathog.* *1*, e17.

- Alexander, W.S., Starr, R., Fenner, J.E., Scott, C.L., Handman, E., Sprigg, N.S., Corbin, J.E., Cornish, A.L., Darwiche, R., Owczarek, C.M., Kay, T.W., Nicola, N.A., Hertzog, P.J., Metcalf, D., and Hilton, D.J. (1999). SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* **98**, 597-608.
- Aliberti, J. (2005). Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 162-170.
- Aliberti, J., Serhan, C., and Sher, A. (2002). Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Exp. Med.* **196**, 1253-1262.
- Aliberti, J., Valenzuela, J.G., Carruthers, V.B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Reis e Sousa, Fairlamb, A., Ribeiro, J.M., and Sher, A. (2003). Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* **4**, 485-490.
- Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A., and Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-708.
- Anderson, P., Yip, Y.K., and Vilcek, J. (1983). Human interferon-gamma is internalized and degraded by cultured fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **258**, 6497-6502.
- Anderson, S.L., Carton, J.M., Lou, J., Xing, L., and Rubin, B.Y. (1999). Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* **256**, 8-14.
- Asundi, V.K., Stahl, R.C., Showalter, L., Conner, K.J., and Carey, D.J. (1994). Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1217**, 257-265.
- Auger, K.R., Carpenter, C.L., Cantley, L.C., and Varticovski, L. (1989). Phosphatidylinositol 3-kinase and its novel product, phosphatidylinositol 3-phosphate, are present in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**, 20181-20184.
- Bach, E.A., Aguet, M., and Schreiber, R.D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 563-591.
- Bader, B., Kuhn, K., Owen, D.J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Kuhlmann, J. (2000). Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction. *Nature* **403**, 223-226.
- Baek, K.J., Thiel, B.A., Lucas, S., and Stuehr, D.J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J. Biol. Chem.* **268**, 21120-21129.
- Bafica, A., Feng, C.G., Santiago, H.C., Aliberti, J., Cheever, A., Thomas, K.E., Taylor, G.A., Vogel, S.N., and Sher, A. (2007). The IFN-inducible GTPase LRG47 (*Irgm1*) negatively regulates TLR4-triggered proinflammatory cytokine production and prevents endotoxemia. *J. Immunol.* **179**, 5514-5522.

- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* *55*, 97-179.
- Balasubramanian, S., Messmer-Blust, A.F., Jeyaratnam, J.A., and Vestal, D.J. (2010). Role of GTP Binding, Isoprenylation, and the C-Terminal alpha-Helices in the Inhibition of Cell Spreading by the Interferon-Induced GTPase, Mouse Guanylate-Binding Protein-2. *J. Interferon Cytokine Res.*
- Bancroft, G.J., Schreiber, R.D., and Unanue, E.R. (1991). Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* *124*, 5-24.
- Barragan, A. and Sibley, L.D. (2002). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* *195*, 1625-1633.
- Barragan, A. and Sibley, L.D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* *11*, 426-430.
- Barylko, B., Binns, D., Lin, K.M., Atkinson, M.A., Jameson, D.M., Yin, H.L., and Albanesi, J.P. (1998). Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* *273*, 3791-3797.
- Bass, B.L., Weintraub, H., Cattaneo, R., and Billeter, M.A. (1989). Biased hypermutation of viral RNA genomes could be due to unwinding/modification of double-stranded RNA. *Cell* *56*, 331.
- Beckers, C.J., Keller, D.S., and Balch, W.E. (1987). Semi-intact cells permeable to macromolecules: use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Cell* *50*, 523-534.
- Behnke, M.S., Wootton, J.C., Lehmann, M.M., Radke, J.B., Lucas, O., Nawas, J., Sibley, L.D., and White, M.W. (2010). Coordinated progression through two subtranscriptomes underlies the tachyzoite cycle of *Toxoplasma gondii*. *PLoS. One.* *5*, e12354.
- Bekpen, C., Hunn, J.P., Rohde, C., Parvanova, I., Guethlein, L., Dunn, D.M., Glowalla, E., Leptin, M., and Howard, J.C. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* *6*, R92.
- Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* *292*, 1552-1555.
- Bernasconi, D., Schultz, U., and Staeheli, P. (1995). The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity. *J. Interferon Cytokine Res.* *15*, 47-53.
- Bian, X., Klemm, R.W., Liu, T.Y., Zhang, M., Sun, S., Sui, X., Liu, X., Rapoport, T.A., and Hu, J. (2011). Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 3976-3981.
- Bigay, J., Deterre, P., Pfister, C., and Chabre, M. (1985). Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the gamma-phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett.* *191*, 181-185.

- Binns,D.D., Barylko,B., Grichine,N., Atkinson,M.A., Helms,M.K., Jameson,D.M., Eccleston,J.F., and Albanesi,J.P. (1999). Correlation between self-association modes and GTPase activation of dynamin. *J. Protein Chem.* *18*, 277-290.
- Binns,D.D., Helms,M.K., Barylko,B., Davis,C.T., Jameson,D.M., Albanesi,J.P., and Eccleston,J.F. (2000). The mechanism of GTP hydrolysis by dynamin II: a transient kinetic study. *Biochemistry* *39*, 7188-7196.
- Blader,I.J. and Saeij,J.P. (2009). Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* *117*, 458-476.
- Bluyssen,H.A., Muzaffar,R., Vliestra,R.J., van der Made,A.C., Leung,S., Stark,G.R., Kerr,I.M., Trapman,J., and Levy,D.E. (1995). Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 5645-5649.
- Boehm,U., Guethlein,L., Klamp,T., Ozbek,K., Schaub,A., Futterer,A., Pfeffer,K., and Howard,J.C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J. Immunol.* *161*, 6715-6723.
- Boehm,U., Klamp,T., Groot,M., and Howard,J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 749-795.
- Bogdan,C., Mattner,J., and Schleicher,U. (2004). The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol. Rev.* *202*, 33-48.
- Bogdan,C., Rollinghoff,M., and Diefenbach,A. (2000). The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* *173*, 17-26.
- Boguski,M.S. and McCormick,F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* *366*, 643-654.
- Bohne,W., Gross,U., Ferguson,D.J., and Heesemann,J. (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (*hsp30/bag1*) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol. Microbiol.* *16*, 1221-1230.
- Boothroyd,J.C. and Grigg,M.E. (2002). Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr. Opin. Microbiol.* *5*, 438-442.
- Boothroyd,J.C., Hehl,A., Knoll,L.J., and Manger,I.D. (1998). The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int. J. Parasitol.* *28*, 3-9.
- Bourne,H.R. (1995). GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *349*, 283-289.
- Bourne,H.R. (1997). G proteins. The arginine finger strikes again. *Nature* *389*, 673-674.
- Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117-127.

- Bourne,H.R., Wrischnik,L., and Kenyon,C. (1990). Ras proteins. Some signal developments. *Nature* *348*, 678-679.
- Boyle,J.P., Rajasekar,B., Saeij,J.P., Ajioka,J.W., Berriman,M., Paulsen,I., Roos,D.S., Sibley,L.D., White,M.W., and Boothroyd,J.C. (2006). Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 10514-10519.
- Bradley,L.M. and Watson,S.R. (1996). Lymphocyte migration into tissue: the paradigm derived from CD4 subsets. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 312-320.
- Briken,V., Ruffner,H., Schultz,U., Schwarz,A., Reis,L.F., Strehlow,I., Decker,T., and Staeheli,P. (1995). Interferon regulatory factor 1 is required for mouse Gbp gene activation by gamma interferon. *Mol. Cell Biol.* *15*, 975-982.
- Britzen-Laurent,N., Bauer,M., Berton,V., Fischer,N., Syguda,A., Reipschlagler,S., Naschberger,E., Herrmann,C., and Sturzl,M. (2010). Intracellular trafficking of guanylate-binding proteins is regulated by heterodimerization in a hierarchical manner. *PLoS. One.* *5*, e14246.
- Brunet,J., Pfaff,A.W., Abidi,A., Unoki,M., Nakamura,Y., Guinard,M., Klein,J.P., Candolfi,E., and Mousli,M. (2008). *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microbiol.* *10*, 908-920.
- Buhrman,G., Holzapfel,G., Fetics,S., and Mattos,C. (2010). Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *107*, 4931-4936.
- Burger,K.N., Demel,R.A., Schmid,S.L., and de Kruijff,B. (2000). Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry* *39*, 12485-12493.
- Butcher,B.A., Greene,R.I., Henry,S.C., Annecharico,K.L., Weinberg,J.B., Denkers,E.Y., Sher,A., and Taylor,G.A. (2005). p47 GTPases regulate *Toxoplasma gondii* survival in activated macrophages. *Infect. Immun.* *73*, 3278-3286.
- Butcher,B.A., Kim,L., Johnson,P.F., and Denkers,E.Y. (2001). *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J. Immunol.* *167*, 2193-2201.
- Byrnes,L.J. and Sondermann,H. (2011). Structural basis for the nucleotide-dependent dimerization of the large G protein atlastin-1/SPG3A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 2216-2221.
- Caamano,J., Alexander,J., Craig,L., Bravo,R., and Hunter,C.A. (1999). The NF-kappa B family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *163*, 4453-4461.
- Cai,G., Kastelein,R., and Hunter,C.A. (2000). Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* *68*, 6932-6938.
- Cao,H., Garcia,F., and McNiven,M.A. (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *9*, 2595-2609.

- Carlow,D.A., Marth,J., Clark-Lewis,I., and Teh,H.S. (1995). Isolation of a gene encoding a developmentally regulated T cell-specific protein with a guanine nucleotide triphosphate-binding motif. *J. Immunol.* *154*, 1724-1734.
- Carlow,D.A., Teh,S.J., and Teh,H.S. (1998). Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J. Immunol.* *161*, 2348-2355.
- Carmen,J.C., Hardi,L., and Sinai,A.P. (2006). Toxoplasma gondii inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell Microbiol.* *8*, 301-315.
- Carr,J.F. and Hinshaw,J.E. (1997). Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. *J. Biol. Chem.* *272*, 28030-28035.
- Carruthers,V. and Boothroyd,J.C. (2007). Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 83-89.
- Carruthers,V.B. (1999). Armed and dangerous: Toxoplasma gondii uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol. Int.* *48*, 1-10.
- Carruthers,V.B. (2002). Host cell invasion by the opportunistic pathogen Toxoplasma gondii. *Acta Trop.* *81*, 111-122.
- Carruthers,V.B., Giddings,O.K., and Sibley,L.D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol.* *1*, 225-235.
- Carruthers,V.B. and Sibley,L.D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* *73*, 114-123.
- Carter,C.C., Gorbacheva,V.Y., and Vestal,D.J. (2005). Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch. Virol.* *150*, 1213-1220.
- Chang,C.H. and Flavell,R.A. (1995). Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J. Exp. Med.* *181*, 765-767.
- Chang,C.H., Hammer,J., Loh,J.E., Fodor,W.L., and Flavell,R.A. (1992). The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Immunogenetics* *35*, 378-384.
- Chappie,J.S., Acharya,S., Leonard,M., Schmid,S.L., and Dyda,F. (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* *465*, 435-440.
- Chappie,J.S., Acharya,S., Liu,Y.W., Leonard,M., Pucadyil,T.J., and Schmid,S.L. (2009). An intramolecular signaling element that modulates dynamin function in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3561-3571.
- Charleston,B. and Stewart,H.J. (1993). An interferon-induced Mx protein: cDNA sequence and high-level expression in the endometrium of pregnant sheep. *Gene* *137*, 327-331.

- Charron,A.J. and Sibley,L.D. (2004). Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic*. *5*, 855-867.
- Chaussabel,D., Semnani,R.T., McDowell,M.A., Sacks,D., Sher,A., and Nutman,T.B. (2003). Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* *102*, 672-681.
- Chavrier,P. and Goud,B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 466-475.
- Chen,J., Baig,E., and Fish,E.N. (2004). Diversity and relatedness among the type I interferons. *J. Interferon Cytokine Res.* *24*, 687-698.
- Chen,M.S., Obar,R.A., Schroeder,C.C., Austin,T.W., Poodry,C.A., Wadsworth,S.C., and Vallee,R.B. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* *351*, 583-586.
- Cheng,Y.S., Becker-Manley,M.F., Chow,T.P., and Horan,D.C. (1985). Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J. Biol. Chem.* *260*, 15834-15839.
- Cheng,Y.S., Colonna,R.J., and Yin,F.H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J. Biol. Chem.* *258*, 7746-7750.
- Cheng,Y.S., Patterson,C.E., and Staeheli,P. (1991). Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol. Cell Biol.* *11*, 4717-4725.
- Chieux,V., Chehadeh,W., Harvey,J., Haller,O., Watre,P., and Hober,D. (2001). Inhibition of coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. *Virology* *283*, 84-92.
- Cohen,S.N., Chang,A.C., and Hsu,L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *69*, 2110-2114.
- Coleman,D.E., Berghuis,A.M., Lee,E., Linder,M.E., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1994). Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* *265*, 1405-1412.
- Collazo,C.M., Yap,G.S., Sempowski,G.D., Lusby,K.C., Tessarollo,L., Woude,G.F., Sher,A., and Taylor,G.A. (2001). Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J. Exp. Med.* *194*, 181-188.
- Collins,J.T. and Dunnick,W.A. (1993). Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma. *Int. Immunol.* *5*, 885-891.
- Cooper,A.M., Dalton,D.K., Stewart,T.A., Griffin,J.P., Russell,D.G., and Orme,I.M. (1993). Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.* *178*, 2243-2247.

- Coppens,I., Dunn,J.D., Romano,J.D., Pypaert,M., Zhang,H., Boothroyd,J.C., and Joiner,K.A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* *125*, 261-274.
- Cossart,P. (2011). Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 19484-19491.
- Crawford,M.J., Thomsen-Zieger,N., Ray,M., Schachtner,J., Roos,D.S., and Seeber,F. (2006). *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *EMBO J.* *25*, 3214-3222.
- Cresswell,P. (1994). Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules. *Curr. Biol.* *4*, 541-543.
- Cristina,N., Darde,M.L., Boudin,C., Tavernier,G., Pestre-Alexandre,M., and Ambroise-Thomas,P. (1995). A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitol. Res.* *81*, 32-37.
- Dai,Q., Choy,E., Chiu,V., Romano,J., Slivka,S.R., Steitz,S.A., Michaelis,S., and Philips,M.R. (1998). Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *273*, 15030-15034.
- Dalton,D.K., Pitts-Meek,S., Keshav,S., Figari,I.S., Bradley,A., and Stewart,T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* *259*, 1739-1742.
- Damke,H., Baba,T., Warnock,D.E., and Schmid,S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* *127*, 915-934.
- Damke,H., Binns,D.D., Ueda,H., Schmid,S.L., and Baba,T. (2001). Dynamin GTPase domain mutants block endocytic vesicle formation at morphologically distinct stages. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2578-2589.
- Darde,M.L., Bouteille,B., and Pestre-Alexandre,M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* *78*, 786-794.
- Daubener,W., Posdziech,V., Hadding,U., and MacKenzie,C.R. (1999). Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med. Microbiol. Immunol.* *187*, 143-147.
- Daubener,W., Remscheid,C., Nockemann,S., Pilz,K., Seghrouchni,S., Mackenzie,C., and Hadding,U. (1996). Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol.* *26*, 487-492.
- Daubener,W., Spors,B., Hucke,C., Adam,R., Stins,M., Kim,K.S., and Schrotten,H. (2001). Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* *69*, 6527-6531.



- David,C., McPherson,P.S., Mundigl,O., and de Camilli,P. (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 331-335.
- David-Watine,B., Israel,A., and Kourilsky,P. (1990). The regulation and expression of MHC class I genes. *Immunol. Today* *11*, 286-292.
- de Souza,W. (2005). Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem. Cell Biol.* *123*, 1-18.
- Debierre-Grockiego,F., Campos,M.A., Azzouz,N., Schmidt,J., Bieker,U., Resende,M.G., Mansur,D.S., Weingart,R., Schmidt,R.R., Golenbock,D.T., Gazzinelli,R.T., and Schwarz,R.T. (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *179*, 1129-1137.
- Degrandi,D., Hoffmann,R., Beuter-Gunia,C., and Pfeffer,K. (2009). The proinflammatory cytokine-induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J. Interferon Cytokine Res.* *29*, 55-67.
- Degrandi,D., Konermann,C., Beuter-Gunia,C., Kresse,A., Wurthner,J., Kurig,S., Beer,S., and Pfeffer,K. (2007). Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J. Immunol.* *179*, 7729-7740.
- Degrandi,D., Kravets,E., Beuter-Gunia,C., Beer,S., and Pfeffer,K. (2012). Increased susceptibility of mGBP2 deficient mice to *T. gondii* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Denkers,E.Y. (1999). T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes. Infect.* *1*, 699-708.
- Denkers,E.Y. and Butcher,B.A. (2005). Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* *21*, 35-41.
- Denkers,E.Y. and Gazzinelli,R.T. (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* *11*, 569-588.
- Dever,T.E., Glynias,M.J., and Merrick,W.C. (1987). GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 1814-1818.
- Di Paolo,C., Hefti,H.P., Meli,M., Landis,H., and Pavlovic,J. (1999). Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization. *J. Biol. Chem.* *274*, 32071-32078.
- Dittmann,J., Stertz,S., Grimm,D., Steel,J., Garcia-Sastre,A., Haller,O., and Kochs,G. (2008). Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J. Virol.* *82*, 3624-3631.
- Duan,Z., Foster,R., Brakora,K.A., Yusuf,R.Z., and Seiden,M.V. (2006). GBP1 overexpression is associated with a paclitaxel resistance phenotype. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *57*, 25-33.
- Dubey,J.P. (1987). *Toxoplasmosis*. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* *17*, 1389-1404.

- Dubey, J.P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* *126*, 57-72.
- Dubey, J.P. (2009). History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* *39*, 877-882.
- Dubey, J.P. and Frenkel, J.K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.* *23*, 537-546.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* *11*, 267-299.
- Dubey, J.P., Miller, N.L., and Frenkel, J.K. (1970a). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* *132*, 636-662.
- Dubey, J.P., Miller, N.L., and Frenkel, J.K. (1970b). *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* *157*, 1767-1770.
- Dubey, J.P., Murrell, K.D., Fayer, R., and Schad, G.A. (1986). Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* *188*, 1035-1037.
- Dubey, J.P., Speer, C.A., Shen, S.K., Kwok, O.C., and Blixt, J.A. (1997). Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* *83*, 870-882.
- Egea, P.F., Shan, S.O., Napetschnig, J., Savage, D.F., Walter, P., and Stroud, R.M. (2004). Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature* *427*, 215-221.
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., and Dubremetz, J.F. (2007). ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* *3*, e14.
- Falkenburger, B.H., Jensen, J.B., Dickson, E.J., Suh, B.C., and Hille, B. (2010). Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J. Physiol* *588*, 3179-3185.
- Farrar, M.A. and Schreiber, R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 571-611.
- Feener, E.P., Rosario, F., Dunn, S.L., Stancheva, Z., and Myers, M.G., Jr. (2004). Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol. Cell Biol.* *24*, 4968-4978.
- Feig, L.A. (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.* *1*, E25-E27.
- Feig, L.A. and Cooper, G.M. (1988). Relationship among guanine nucleotide exchange, GTP hydrolysis, and transforming potential of mutated ras proteins. *Mol. Cell Biol.* *8*, 2472-2478.
- Feng, C.G., Collazo-Custodio, C.M., Eckhaus, M., Hieny, S., Belkaid, Y., Elkins, K., Jankovic, D., Taylor, G.A., and Sher, A. (2004). Mice deficient in LRG-47 display increased susceptibility to

- mycobacterial infection associated with the induction of lymphopenia. *J. Immunol.* *172*, 1163-1168.
- Feng, C.G., Weksberg, D.C., Taylor, G.A., Sher, A., and Goodell, M.A. (2008a). The p47 GTPase Lrg-47 (Irgm1) links host defense and hematopoietic stem cell proliferation. *Cell Stem Cell* *2*, 83-89.
- Feng, C.G., Zheng, L., Jankovic, D., Bafica, A., Cannons, J.L., Watford, W.T., Chaussabel, D., Hieny, S., Caspar, P., Schwartzberg, P.L., Lenardo, M.J., and Sher, A. (2008b). The immunity-related GTPase Irgm1 promotes the expansion of activated CD4<sup>+</sup> T cell populations by preventing interferon-gamma-induced cell death. *Nat. Immunol.* *9*, 1279-1287.
- Ferguson, D.J. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *104*, 133-148.
- Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Chapgier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Feinberg, J., Jouanguy, E., Boisson-Dupuis, S., Fieschi, C., Picard, C., and Casanova, J.L. (2006). Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin. Immunol.* *18*, 347-361.
- Finazzi, D., Cassel, D., Donaldson, J.G., and Klausner, R.D. (1994). Aluminum fluoride acts on the reversibility of ARF1-dependent coat protein binding to Golgi membranes. *J. Biol. Chem.* *269*, 13325-13330.
- Fleckenstein, M.C., Reese, M.L., Konen-Waisman, S., Boothroyd, J.C., Howard, J.C., and Steinfeldt, T. (2012). A *Toxoplasma gondii* Pseudokinase Inhibits Host IRG Resistance Proteins. *PLoS Biol.* *10*, e1001358.
- Focia, P.J., Shepotinovskaya, I.V., Seidler, J.A., and Freymann, D.M. (2004). Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science* *303*, 373-377.
- Fountoulakis, M., Zulauf, M., Lustig, A., and Garotta, G. (1992). Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor. *Eur. J. Biochem.* *208*, 781-787.
- Fox, B.A., Gigley, J.P., and Bzik, D.J. (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int. J. Parasitol.* *34*, 323-331.
- Frech, M., Darden, T.A., Pedersen, L.G., Foley, C.K., Charifson, P.S., Anderson, M.W., and Wittinghofer, A. (1994). Role of glutamine-61 in the hydrolysis of GTP by p21H-ras: an experimental and theoretical study. *Biochemistry* *33*, 3237-3244.
- Frenkel, J.K. (1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today* *4*, 273-278.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P., and Miller, N.L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* *167*, 893-896.
- Fres, J.M., Muller, S., and Praefcke, G.J. (2010). Purification of the CaaX-modified, dynamin-related large GTPase hGBP1 by coexpression with farnesyltransferase. *J. Lipid Res.* *51*, 2454-2459.

- Frese, M., Kochs, G., Meier-Dieter, U., Siebler, J., and Haller, O. (1995). Human MxA protein inhibits tick-borne Thogoto virus but not Dhori virus. *J. Virol.* *69*, 3904-3909.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., and Koyasu, S. (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* *22*, 556-560.
- Fujita, T., Reis, L.F., Watanabe, N., Kimura, Y., Taniguchi, T., and Vilcek, J. (1989). Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 9936-9940.
- Futatsugi, N., Hata, M., Hoshino, T., and Tsuda, M. (1999). Ab initio study of the role of lysine 16 for the molecular switching mechanism of Ras protein p21. *Biophys. J.* *77*, 3287-3292.
- Fux, B., Rodrigues, C.V., Portela, R.W., Silva, N.M., Su, C., Sibley, D., Vitor, R.W., and Gazzinelli, R.T. (2003). Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* *71*, 6392-6401.
- Gao, P.Q., Sims, S.H., Chang, D.C., and Deisseroth, A.B. (1993). Interferon-gamma priming effects in the activation and deactivation of ISGF3 in K562 cells. *J. Biol. Chem.* *268*, 12380-12387.
- Gao, S., von der, M.A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G., and Daumke, O. (2010). Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* *465*, 502-506.
- Garrido, C., Schmitt, E., Cande, C., Vahsen, N., Parcellier, A., and Kroemer, G. (2003). HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* *2*, 579-584.
- Gasper, R., Meyer, S., Gotthardt, K., Sirajuddin, M., and Wittinghofer, A. (2009). It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 423-429.
- Gasper, R., Thomas, C., Ahmadian, M.R., and Wittinghofer, A. (2008). The role of the conserved switch II glutamate in guanine nucleotide exchange factor-mediated nucleotide exchange of GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* *379*, 51-63.
- Gazzinelli, R.T. and Denkers, E.Y. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 895-906.
- Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., and Sher, A. (1993). Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 6115-6119.
- Gazzinelli, R.T., Ropert, C., and Campos, M.A. (2004). Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol. Rev.* *201*, 9-25.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., and Sher, A. (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *153*, 2533-2543.

- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* *157*, 798-805.
- Geyer, M., Schweins, T., Herrmann, C., Prisner, T., Wittinghofer, A., and Kalbitzer, H.R. (1996). Conformational transitions in p21ras and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP. *Biochemistry* *35*, 10308-10320.
- Ghosh, A., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2006). How guanylate-binding proteins achieve assembly-stimulated processive cleavage of GTP to GMP. *Nature* *440*, 101-104.
- Ghosh, A., Uthaiyah, R., Howard, J., Herrmann, C., and Wolf, E. (2004). Crystal structure of IIGP1: a paradigm for interferon-inducible p47 resistance GTPases. *Mol. Cell* *15*, 727-739.
- Gilbert, L.A., Ravindran, S., Turetzky, J.M., Boothroyd, J.C., and Bradley, P.J. (2007). *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryot. Cell* *6*, 73-83.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* *182*, 319-326.
- Gilly, M. and Wall, R. (1992). The IRG-47 gene is IFN- $\gamma$  induced in B cells and encodes a protein with GTP-binding motifs. *J. Immunol.* *148*, 3275-3281.
- Goebel, S., Gross, U., and Luder, C.G. (2001). Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *J. Cell Sci.* *114*, 3495-3505.
- Goetschy, J.F., Zeller, H., Content, J., and Horisberger, M.A. (1989). Regulation of the interferon-inducible IFI-78K gene, the human equivalent of the murine Mx gene, by interferons, double-stranded RNA, certain cytokines, and viruses. *J. Virol.* *63*, 2616-2622.
- Gold, E.S., Underhill, D.M., Morrissette, N.S., Guo, J., McNiven, M.A., and Aderem, A. (1999). Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* *190*, 1849-1856.
- Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* *95*, 237-248.
- Gorbacheva, V.Y., Lindner, D., Sen, G.C., and Vestal, D.J. (2002). The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN- $\gamma$ -induced murine fibroblast proliferation. *J. Biol. Chem.* *277*, 6080-6087.
- Gould, S.J., Keller, G.A., and Subramani, S. (1988). Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell Biol.* *107*, 897-905.
- Gout, I., Dhand, R., Hiles, I.D., Fry, M.J., Panayotou, G., Das, P., Truong, O., Totty, N.F., Hsuan, J., Booker, G.W., and . (1993). The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell* *75*, 25-36.

- Graham, M.B., Dalton, D.K., Giltinan, D., Braciale, V.L., Stewart, T.A., and Braciale, T.J. (1993). Response to influenza infection in mice with a targeted disruption in the interferon gamma gene. *J. Exp. Med.* *178*, 1725-1732.
- Greenlund, A.C., Farrar, M.A., Viviano, B.L., and Schreiber, R.D. (1994). Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* *13*, 1591-1600.
- Greenlund, A.C., Morales, M.O., Viviano, B.L., Yan, H., Krolewski, J., and Schreiber, R.D. (1995). Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity.* *2*, 677-687.
- Greenlund, A.C., Schreiber, R.D., Goeddel, D.V., and Pennica, D. (1993). Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J. Biol. Chem.* *268*, 18103-18110.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., and Kloetzel, P.M. (1996). A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* *26*, 863-869.
- Guenzi, E., Topolt, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jorg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmler, M., Hohenadl, C., Barillari, G., Tschachler, E., Monini, P., Ensoli, B., and Sturzl, M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.* *20*, 5568-5577.
- Guenzi, E., Topolt, K., Lubeseder-Martellato, C., Jorg, A., Naschberger, E., Benelli, R., Albini, A., and Sturzl, M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* *22*, 3772-3782.
- Gupta, J.W., Kubin, M., Hartman, L., Cassatella, M., and Trinchieri, G. (1992). Induction of expression of genes encoding components of the respiratory burst oxidase during differentiation of human myeloid cell lines induced by tumor necrosis factor and gamma-interferon. *Cancer Res.* *52*, 2530-2537.
- Gupta, N., Zahn, M.M., Coppens, I., Joiner, K.A., and Voelker, D.R. (2005). Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J. Biol. Chem.* *280*, 16345-16353.
- Gupta, S.L., Carlin, J.M., Pyati, P., Dai, W., Pfefferkorn, E.R., and Murphy, M.J., Jr. (1994). Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect. Immun.* *62*, 2277-2284.
- Gupta, S.L., Rubin, B.Y., and Holmes, S.L. (1979). Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 4817-4821.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* *119*, 753-766.

- Hakansson,S., Charron,A.J., and Sibley,L.D. (2001). Toxoplasma vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* *20*, 3132-3144.
- Haller,O., Frese,M., and Kochs,G. (1998). Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev. Sci. Tech.* *17*, 220-230.
- Haller,O., Gao,S., von der,M.A., Daumke,O., and Kochs,G. (2010). Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity. *J. Biol. Chem.* *285*, 28419-28424.
- Haller,O. and Kochs,G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.* *3*, 710-717.
- Halonen,S.K., Taylor,G.A., and Weiss,L.M. (2001). Gamma interferon-induced inhibition of Toxoplasma gondii in astrocytes is mediated by IGTP. *Infect. Immun.* *69*, 5573-5576.
- Halonen,S.K. and Weidner,E. (1994). Overcoating of Toxoplasma parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J. Eukaryot. Microbiol.* *41*, 65-71.
- Halonen,S.K. and Weiss,L.M. (2000). Investigation into the mechanism of gamma interferon-mediated inhibition of Toxoplasma gondii in murine astrocytes. *Infect. Immun.* *68*, 3426-3430.
- Han,B.H., Park,D.J., Lim,R.W., Im,J.H., and Kim,H.D. (1998). Cloning, expression, and characterization of a novel guanylate-binding protein, GBP3 in murine erythroid progenitor cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1384*, 373-386.
- Hanahan,D. and Meselson,M. (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* *100*, 333-342.
- Hancock,J.F., Cadwallader,K., Paterson,H., and Marshall,C.J. (1991). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J.* *10*, 4033-4039.
- Hanson,P.I. and Whiteheart,S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 519-529.
- Harley,C.A., Dasgupta,A., and Wilson,D.W. (2001). Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J. Virol.* *75*, 1236-1251.
- Hayes,M.P., Wang,J., and Norcross,M.A. (1995). Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* *86*, 646-650.
- Heim,M.H., Kerr,I.M., Stark,G.R., and Darnell,J.E., Jr. (1995). Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* *267*, 1347-1349.
- Henley,J.R., Krueger,E.W., Oswald,B.J., and McNiven,M.A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* *141*, 85-99.

- Henry,S.C., Daniell,X., Indaram,M., Whitesides,J.F., Sempowski,G.D., Howell,D., Oliver,T., and Taylor,G.A. (2007). Impaired macrophage function underscores susceptibility to Salmonella in mice lacking *Irgm1* (LRG-47). *J. Immunol.* *179*, 6963-6972.
- Heo,W.D., Inoue,T., Park,W.S., Kim,M.L., Park,B.O., Wandless,T.J., and Meyer,T. (2006). PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* *314*, 1458-1461.
- Herrmann,C. and Nassar,N. (1996). Ras and its effectors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *66*, 1-41.
- Herskovits,J.S., Burgess,C.C., Obar,R.A., and Vallee,R.B. (1993a). Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J. Cell Biol.* *122*, 565-578.
- Herskovits,J.S., Shpetner,H.S., Burgess,C.C., and Vallee,R.B. (1993b). Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 11468-11472.
- Heufler,C., Koch,F., Stanzl,U., Topar,G., Wysocka,M., Trinchieri,G., Enk,A., Steinman,R.M., Romani,N., and Schuler,G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.* *26*, 659-668.
- Hilgenfeld,R. (1995). Regulatory GTPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *5*, 810-817.
- Hinshaw,J.E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 483-519.
- Hinshaw,J.E. and Schmid,S.L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* *374*, 190-192.
- Hiratsuka,T. (1983). New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* *742*, 496-508.
- Horisberger,M.A. (1992). Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J. Virol.* *66*, 4705-4709.
- Horisberger,M.A. and Gunst,M.C. (1991). Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. *Virology* *180*, 185-190.
- Horisberger,M.A. and Hochkeppel,H.K. (1987). IFN-alpha induced human 78 kD protein: purification and homologies with the mouse Mx protein, production of monoclonal antibodies, and potentiation effect of IFN-gamma. *J. Interferon Res.* *7*, 331-343.
- Hou,B., Benson,A., Kuzmich,L., DeFranco,A.L., and Yarovinsky,F. (2011). Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 278-283.
- Howe,D.K., Honore,S., Derouin,F., and Sibley,L.D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* *35*, 1411-1414.



- Howe,D.K. and Sibley,L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* *172*, 1561-1566.
- Hu,X. and Ivashkiv,L.B. (2009). Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity.* *31*, 539-550.
- Huang,R.P., Wu,J.X., Fan,Y., and Adamson,E.D. (1996). UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J. Cell Biol.* *133*, 211-220.
- Huang,S., Hendriks,W., Althage,A., Hemmi,S., Bluethmann,H., Kamijo,R., Vilcek,J., Zinkernagel,R.M., and Aguet,M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* *259*, 1742-1745.
- Hunn,J.P., Feng,C.G., Sher,A., and Howard,J.C. (2011). The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. *Mamm. Genome* *22*, 43-54.
- Hunn,J.P. and Howard,J.C. (2010). The mouse resistance protein *Irgm1* (LRG-47): a regulator or an effector of pathogen defense? *PLoS. Pathog.* *6*, e1001008.
- Hunn,J.P., Koenen-Waisman,S., Papic,N., Schroeder,N., Pawlowski,N., Lange,R., Kaiser,F., Zerrahn,J., Martens,S., and Howard,J.C. (2008). Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* *27*, 2495-2509.
- Hunter,C.A., Chizzonite,R., and Remington,J.S. (1995). IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J. Immunol.* *155*, 4347-4354.
- Hwang,I.Y., Quan,J.H., Ahn,M.H., Ahmed,H.A., Cha,G.H., Shin,D.W., and Lee,Y.H. (2010). *Toxoplasma gondii* infection inhibits the mitochondrial apoptosis through induction of Bcl-2 and HSP70. *Parasitol. Res.* *107*, 1313-1321.
- Igarashi,K., Garotta,G., Ozmen,L., Ziemiecki,A., Wilks,A.F., Harpur,A.G., Larner,A.C., and Finbloom,D.S. (1994). Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 14333-14336.
- Israel,A., Kimura,A., Kieran,M., Yano,O., Kanellopoulos,J., Le Bail,O., and Kourilsky,P. (1987). A common positive trans-acting factor binds to enhancer sequences in the promoters of mouse H-2 and beta 2-microglobulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 2653-2657.
- Itsui,Y., Sakamoto,N., Kakinuma,S., Nakagawa,M., Sekine-Osajima,Y., Tasaka-Fujita,M., Nishimura-Sakurai,Y., Suda,G., Karakama,Y., Mishima,K., Yamamoto,M., Watanabe,T., Ueyama,M., Funaoka,Y., Azuma,S., and Watanabe,M. (2009). Antiviral effects of the interferon-induced protein guanylate binding protein 1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. *Hepatology* *50*, 1727-1737.
- Jankovic,D., Kullberg,M.C., Feng,C.G., Goldszmid,R.S., Collazo,C.M., Wilson,M., Wynn,T.A., Kamanaka,M., Flavell,R.A., and Sher,A. (2007). Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* *204*, 273-283.

- Janzen,C., Kochs,G., and Haller,O. (2000). A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J. Virol.* *74*, 8202-8206.
- Johannes,L., Kambadur,R., Lee-Hellmich,H., Hodgkinson,C.A., Arnheiter,H., and Meier,E. (1997). Antiviral determinants of rat Mx GTPases map to the carboxy-terminal half. *J. Virol.* *71*, 9792-9795.
- John,J., Sohmen,R., Feuerstein,J., Linke,R., Wittinghofer,A., and Goody,R.S. (1990). Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* *29*, 6058-6065.
- Johnson,D.R. and Pober,J.S. (1990). Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 5183-5187.
- Joiner,K.A. and Roos,D.S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J. Cell Biol.* *157*, 557-563.
- Jones,L.A., Alexander,J., and Roberts,C.W. (2006). Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. *Parasite Immunol.* *28*, 635-642.
- Jouanguy,E., Doffinger,R., Dupuis,S., Pallier,A., Altare,F., and Casanova,J.L. (1999). IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 346-351.
- Kaiser,F., Kaufmann,S.H., and Zerrahn,J. (2004). IIGP, a member of the IFN inducible and microbial defense mediating 47 kDa GTPase family, interacts with the microtubule binding protein hook3. *J. Cell Sci.* *117*, 1747-1756.
- Karaghiosoff,M., Neubauer,H., Lassnig,C., Kovarik,P., Schindler,H., Pircher,H., McCoy,B., Bogdan,C., Decker,T., Brem,G., Pfeffer,K., and Muller,M. (2000). Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity.* *13*, 549-560.
- Kasper,L.H. (1989). Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* *57*, 668-672.
- Kato,K., Cox,A.D., Hisaka,M.M., Graham,S.M., Buss,J.E., and Der,C.J. (1992). Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 6403-6407.
- Kerr,I.M. and Stark,G.R. (1991). The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS Lett.* *285*, 194-198.
- Kerstan,A., Ladnorg,T., Grunwald,C., Vopel,T., Zacher,D., Herrmann,C., and Woll,C. (2010). Human guanylate-binding protein 1 as a model system investigated by several surface techniques. *Biointerphases.* *5*, 131-138.
- Khaminets,A., Hunn,J.P., Konen-Waisman,S., Zhao,Y.O., Preukschat,D., Coers,J., Boyle,J.P., Ong,Y.C., Boothroyd,J.C., Reichmann,G., and Howard,J.C. (2010). Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol.* *12*, 939-961.

- Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Das, R., Tiwari, S., and MacMicking, J.D. (2011). A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science* *332*, 717-721.
- Kim, K. and Weiss, L.M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int. J. Parasitol.* *34*, 423-432.
- Kim, K. and Weiss, L.M. (2008). *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes. Infect.* *10*, 978-984.
- Kim, L., Butcher, B.A., and Denkers, E.Y. (2004). *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. *J. Immunol.* *172*, 3003-3010.
- Kim, S.K., Fouts, A.E., and Boothroyd, J.C. (2007). *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J. Immunol.* *178*, 5154-5165.
- Kimura, T., Nakayama, K., Penninger, J., Kitagawa, M., Harada, H., Matsuyama, T., Tanaka, N., Kamijo, R., Vilcek, J., Mak, T.W., and . (1994). Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science* *264*, 1921-1924.
- Kinsella, B.T., Erdman, R.A., and Maltese, W.A. (1991). Posttranslational modification of Ha-ras p21 by farnesyl versus geranylgeranyl isoprenoids is determined by the COOH-terminal amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 8934-8938.
- Klein, D.E., Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S., and Lemmon, M.A. (1998). The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J. Biol. Chem.* *273*, 27725-27733.
- Knight E Jr and Korant, B.D. (1979). Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 1824-1827.
- Knudsen, C., Wieden, H.J., and Rodnina, M.V. (2001). The importance of structural transitions of the switch II region for the functions of elongation factor Tu on the ribosome. *J. Biol. Chem.* *276*, 22183-22190.
- Kochs, G., Haener, M., Aebi, U., and Haller, O. (2002). Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. *J. Biol. Chem.* *277*, 14172-14176.
- Kochs, G. and Haller, O. (1999). GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J. Biol. Chem.* *274*, 4370-4376.
- Kochs, G., Reichelt, M., Danino, D., Hinshaw, J.E., and Haller, O. (2005). Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods Enzymol.* *404*, 632-643.
- Kochs, G., Trost, M., Janzen, C., and Haller, O. (1998). MxA GTPase: oligomerization and GTP-dependent interaction with viral RNP target structures. *Methods* *15*, 255-263.
- Konermann, C. Die Rolle der IFN- $\alpha$  induzierten 65 kDa Guanylat-bindenden Proteine mGBP1 bis mGBP5 als Effektormoleküle bei der Erregerabwehr. 2008.
- Ref Type: Thesis/Dissertation

- Konermann,C., Kresse,A., Beuter-Gunia,C., Wurthner,J., Degrandi,D., Pfeffer,K., and Beer,S. (2007). In silico and in vitro characterization of mGBP4 splice variants. *DNA Cell Biol.* *26*, 847-851.
- Kravets,E., Degrandi,D., Weidtkamp-Peters,S., Tschapek-Ries,B., Konermann,C., Felekyan,S., Dargazanli,J.M., Praefcke,G.J., Seidel,C.A., Schmitt,L., Smits,S.H., and Pfeffer,K. (2012). The GTPase activity of murine guanylate-binding protein 2 (mGBP2) controls the intracellular localization and recruitment to the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.*
- Kresse,A., Konermann,C., Degrandi,D., Beuter-Gunia,C., Wuerthner,J., Pfeffer,K., and Beer,S. (2008). Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC. Genomics* *9*, 158.
- Krishnan,K.S., Rikhy,R., Rao,S., Shivalkar,M., Mosko,M., Narayanan,R., Etter,P., Estes,P.S., and Ramaswami,M. (2001). Nucleoside diphosphate kinase, a source of GTP, is required for dynamin-dependent synaptic vesicle recycling. *Neuron* *30*, 197-210.
- Kroemer,G. and Levine,B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 1004-1010.
- Kunzelmann,S., Praefcke,G.J., and Herrmann,C. (2005). Nucleotide binding and self-stimulated GTPase activity of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1). *Methods Enzymol.* *404*, 512-527.
- Kunzelmann,S., Praefcke,G.J., and Herrmann,C. (2006). Transient kinetic investigation of GTP hydrolysis catalyzed by interferon-gamma-induced hGBP1 (human guanylate binding protein 1). *J. Biol. Chem.* *281*, 28627-28635.
- Lafuse,W.P., Brown,D., Castle,L., and Zwilling,B.S. (1995a). Cloning and characterization of a novel cDNA that is IFN-gamma-induced in mouse peritoneal macrophages and encodes a putative GTP-binding protein. *J. Leukoc. Biol.* *57*, 477-483.
- Lafuse,W.P., Brown,D., Castle,L., and Zwilling,B.S. (1995b). IFN-gamma increases cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *57*, 663-669.
- Lah,T.T., Hawley,M., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1995). Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS Lett.* *363*, 85-89.
- Laliberte,J. and Carruthers,V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol. Life Sci.* *65*, 1900-1915.
- Lambert,H., Dellacasa-Lindberg,I., and Barragan,A. (2011). Migratory responses of leukocytes infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes. Infect.* *13*, 96-102.
- Landis,H., Simon-Jodicke,A., Kloti,A., Di Paolo,C., Schnorr,J.J., Schneider-Schaulies,S., Hefti,H.P., and Pavlovic,J. (1998). Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J. Virol.* *72*, 1516-1522.

- Lang,C., Algner,M., Beinert,N., Gross,U., and Luder,C.G. (2006). Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. *Microbes. Infect.* **8**, 1994-2005.
- Lang,C., Gross,U., and Luder,C.G. (2007). Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* **100**, 191-203.
- Lavie,A., Ostermann,N., Brundiers,R., Goody,R.S., Reinstein,J., Konrad,M., and Schlichting,I. (1998). Structural basis for efficient phosphorylation of 3'-azidothymidine monophosphate by *Escherichia coli* thymidylate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 14045-14050.
- Lederer,J.A., Perez,V.L., DesRoches,L., Kim,S.M., Abbas,A.K., and Lichtman,A.H. (1996). Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J. Exp. Med.* **184**, 397-406.
- Lee,A., Frank,D.W., Marks,M.S., and Lemmon,M.A. (1999). Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr. Biol.* **9**, 261-264.
- Lee,E. and de Camilli,P. (2002). Dynamin at actin tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 161-166.
- Lee,S.B. and Esteban,M. (1993). The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase inhibits the replication of vaccinia virus. *Virology* **193**, 1037-1041.
- Lenzen,C., Cool,R.H., and Wittinghofer,A. (1995). Analysis of intrinsic and CDC25-stimulated guanine nucleotide exchange of p21ras-nucleotide complexes by fluorescence measurements. *Methods Enzymol.* **255**, 95-109.
- Lew,D.J., Decker,T., Strehlow,I., and Darnell,J.E. (1991). Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol. Cell Biol.* **11**, 182-191.
- Liesenfeld,O., Parvanova,I., Zerrahn,J., Han,S.J., Heinrich,F., Munoz,M., Kaiser,F., Aebischer,T., Buch,T., Waisman,A., Reichmann,G., Utermohlen,O., von Stebut,E., von Loewenich,F.D., Bogdan,C., Specht,S., Saftel,M., Hoerauf,A., Mota,M.M., Konen-Waisman,S., Kaufmann,S.H., and Howard,J.C. (2011). The IFN-gamma-inducible GTPase, Irga6, protects mice against *Toxoplasma gondii* but not against *Plasmodium berghei* and some other intracellular pathogens. *PLoS. One.* **6**, e20568.
- LINDENMANN,J. (1962). Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology* **16**, 203-204.
- LINDENMANN,J. (1964). INHERITANCE OF RESISTANCE TO INFLUENZA VIRUS IN MICE. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **116**, 506-509.
- Ling,Y.M., Shaw,M.H., Ayala,C., Coppens,I., Taylor,G.A., Ferguson,D.J., and Yap,G.S. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J. Exp. Med.* **203**, 2063-2071.

- Lingelbach, K. and Joiner, K.A. (1998). The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J. Cell Sci.* *111* (*Pt 11*), 1467-1475.
- Lubeseder-Martellato, C., Guenzi, E., Jorg, A., Topolt, K., Naschberger, E., Kremmer, E., Zietz, C., Tschachler, E., Hutzler, P., Schwemmler, M., Matzen, K., Grimm, T., Ensoli, B., and Sturzl, M. (2002). Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am. J. Pathol.* *161*, 1749-1759.
- Luder, C.G., Algner, M., Lang, C., Bleicher, N., and Gross, U. (2003). Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Int. J. Parasitol.* *33*, 833-844.
- Luder, C.G., Lang, T., Beuerle, B., and Gross, U. (1998). Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin. Exp. Immunol.* *112*, 308-316.
- Luder, C.G., Walter, W., Beuerle, B., Maeurer, M.J., and Gross, U. (2001). *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1475-1484.
- Luft, B.J. and Remington, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* *15*, 211-222.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* *154*, 5071-5079.
- Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., and Reith, W. (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 301-331.
- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 323-350.
- MacMicking, J.D. (2004). IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol.* *25*, 601-609.
- MacMicking, J.D. (2005). Immune control of phagosomal bacteria by p47 GTPases. *Curr. Opin. Microbiol.* *8*, 74-82.
- MacMicking, J.D., Taylor, G.A., and McKinney, J.D. (2003). Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* *302*, 654-659.
- Maegley, K.A., Admiraal, S.J., and Herschlag, D. (1996). Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: a new perspective from model studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 8160-8166.
- Majumdar, S., Ramachandran, S., and Cerione, R.A. (2006). New insights into the role of conserved, essential residues in the GTP binding/GTP hydrolytic cycle of large G proteins. *J. Biol. Chem.* *281*, 9219-9226.

- Malik,S., Abel,L., Tooker,H., Poon,A., Simkin,L., Girard,M., Adams,G.J., Starke,J.R., Smith,K.C., Graviss,E.A., Musser,J.M., and Schurr,E. (2005). Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 12183-12188.
- Maltese,W.A., Wilson,A.L., and Erdman,R.A. (1996). Prenylation-dependent interaction of Rab proteins with GDP dissociation inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* *24*, 703-708.
- Marks,B., Stowell,M.H., Vallis,Y., Mills,I.G., Gibson,A., Hopkins,C.R., and McMahon,H.T. (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* *410*, 231-235.
- Martens,S. and Howard,J. (2006). The interferon-inducible GTPases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 559-589.
- Martens,S., Parvanova,I., Zerrahn,J., Griffiths,G., Schell,G., Reichmann,G., and Howard,J.C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS. Pathog.* *1*, e24.
- Martens,S., Sabel,K., Lange,R., Uthaiiah,R., Wolf,E., and Howard,J.C. (2004). Mechanisms regulating the positioning of mouse p47 resistance GTPases LRG-47 and IIGP1 on cellular membranes: retargeting to plasma membrane induced by phagocytosis. *J. Immunol.* *173*, 2594-2606.
- Martin,A.M., Liu,T., Lynn,B.C., and Sinai,A.P. (2007). The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J. Eukaryot. Microbiol.* *54*, 25-28.
- McNiven,M.A. (1998). Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell* *94*, 151-154.
- Meier,E., Fah,J., Grob,M.S., End,R., Staeheli,P., and Haller,O. (1988). A family of interferon-induced Mx-related mRNAs encodes cytoplasmic and nuclear proteins in rat cells. *J. Virol.* *62*, 2386-2393.
- Melen,K., Ronni,T., Broni,B., Krug,R.M., von Bonsdorff,C.H., and Julkunen,I. (1992). Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper. *J. Biol. Chem.* *267*, 25898-25907.
- Melo,E.J., Carvalho,T.M., and de Souza,W. (2001). Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell* *25*, 53-59.
- Messmer-Blust,A.F., Balasubramanian,S., Gorbacheva,V.Y., Jeyaratnam,J.A., and Vestal,D.J. (2010). The interferon-gamma-induced murine guanylate-binding protein-2 inhibits rac activation during cell spreading on fibronectin and after platelet-derived growth factor treatment: role for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Biol. Cell* *21*, 2514-2528.
- Mettlen,M., Pucadyil,T., Ramachandran,R., and Schmid,S.L. (2009). Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 1022-1026.
- Meurs,E.F., Watanabe,Y., Kadereit,S., Barber,G.N., Katze,M.G., Chong,K., Williams,B.R., and Hovanessian,A.G. (1992). Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *J. Virol.* *66*, 5805-5814.

- Minns,L.A., Menard,L.C., Foureau,D.M., Darche,S., Ronet,C., Mielcarz,D.W., Buzoni-Gatel,D., and Kasper,L.H. (2006). TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *176*, 7589-7597.
- Mittal,R., Ahmadian,M.R., Goody,R.S., and Wittinghofer,A. (1996). Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Ras-GDP, tetrafluoroaluminate, and GTPase-activating proteins. *Science* *273*, 115-117.
- Miyairi,I., Tatireddigari,V.R., Mahdi,O.S., Rose,L.A., Belland,R.J., Lu,L., Williams,R.W., and Byrne,G.I. (2007). The p47 GTPases Iigp2 and Irgb10 regulate innate immunity and inflammation to murine *Chlamydia psittaci* infection. *J. Immunol.* *179*, 1814-1824.
- Mizushima,N., Ohsumi,Y., and Yoshimori,T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* *27*, 421-429.
- Modiano,N., Lu,Y.E., and Cresswell,P. (2005). Golgi targeting of human guanylate-binding protein-1 requires nucleotide binding, isoprenylation, and an IFN-gamma-inducible cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 8680-8685.
- Molestina,R.E., El Guendy,N., and Sinai,A.P. (2008). Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cell Microbiol.* *10*, 1153-1165.
- Molestina,R.E., Payne,T.M., Coppens,I., and Sinai,A.P. (2003). Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell Sci.* *116*, 4359-4371.
- Molestina,R.E. and Sinai,A.P. (2005a). Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host IkappaBalpha. *Cell Microbiol.* *7*, 351-362.
- Molestina,R.E. and Sinai,A.P. (2005b). Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF-kappaB activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. *J. Cell Sci.* *118*, 5785-5796.
- Montoya,G., Kaat,K., Moll,R., Schafer,G., and Sinning,I. (2000). The crystal structure of the conserved GTPase of SRP54 from the archaeon *Acidianus ambivalens* and its comparison with related structures suggests a model for the SRP-SRP receptor complex. *Structure.* *8*, 515-525.
- Montoya,J.G. and Liesenfeld,O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* *363*, 1965-1976.
- Montoya,J.G. and Remington,J.S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* *47*, 554-566.
- Moores,S.L., Schaber,M.D., Mosser,S.D., Rands,E., O'Hara,M.B., Garsky,V.M., Marshall,M.S., Pompliano,D.L., and Gibbs,J.B. (1991). Sequence dependence of protein isoprenylation. *J. Biol. Chem.* *266*, 14603-14610.



- Mordue,D.G., Desai,N., Dustin,M., and Sibley,L.D. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* *190*, 1783-1792.
- Mordue,D.G., Monroy,F., La Regina,M., Dinarello,C.A., and Sibley,L.D. (2001). Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.* *167*, 4574-4584.
- Morris,S.M., Jr. and Billiar,T.R. (1994). New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol* *266*, E829-E839.
- Mosmann,T.R. and Coffman,R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* *7*, 145-173.
- Moss,J. and Vaughan,M. (1995). Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J. Biol. Chem.* *270*, 12327-12330.
- Muhlberg,A.B., Warnock,D.E., and Schmid,S.L. (1997). Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* *16*, 6676-6683.
- Muller,M., Winnacker,E.L., and Brem,G. (1992). Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. *J. Interferon Res.* *12*, 119-129.
- Muller,U., Steinhoff,U., Reis,L.F., Hemmi,S., Pavlovic,J., Zinkernagel,R.M., and Aguet,M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* *264*, 1918-1921.
- Mun,H.S., Aosai,F., Norose,K., Piao,L.X., Fang,H., Akira,S., and Yano,A. (2005). Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. *Infect. Immun.* *73*, 4634-4642.
- Murphy, K. M., Travers, P., and Walport, M. *Janeway Immunologie.* 2009.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Murray,P.J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.* *178*, 2623-2629.
- Murray,P.J., Young,R.A., and Daley,G.Q. (1998). Hematopoietic remodeling in interferon-gamma-deficient mice infected with mycobacteria. *Blood* *91*, 2914-2924.
- Nakayama,M., Yazaki,K., Kusano,A., Nagata,K., Hanai,N., and Ishihama,A. (1993). Structure of mouse Mx1 protein. Molecular assembly and GTP-dependent conformational change. *J. Biol. Chem.* *268*, 15033-15038.
- Nantais,D.E., Schwemmle,M., Stickney,J.T., Vestal,D.J., and Buss,J.E. (1996). Prenylation of an interferon-gamma-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1. *J. Leukoc. Biol.* *60*, 423-431.
- Naschberger,E., Croner,R.S., Merkel,S., Dimmler,A., Tripal,P., Amann,K.U., Kremmer,E., Brueckl,W.M., Papadopoulos,T., Hohenadl,C., Hohenberger,W., and Sturzl,M. (2008).

- Angiostatic immune reaction in colorectal carcinoma: Impact on survival and perspectives for antiangiogenic therapy. *Int. J. Cancer* *123*, 2120-2129.
- Nash,P.B., Purner,M.B., Leon,R.P., Clarke,P., Duke,R.C., and Curiel,T.J. (1998). Toxoplasma gondii-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* *160*, 1824-1830.
- Nassar,N., Hoffman,G.R., Manor,D., Clardy,J.C., and Cerione,R.A. (1998). Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 1047-1052.
- Nathan,C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* *6*, 3051-3064.
- Nathan,C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest* *100*, 2417-2423.
- Nathan,C. and Shiloh,M.U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 8841-8848.
- Nelson,D.E., Virok,D.P., Wood,H., Roshick,C., Johnson,R.M., Whitmire,W.M., Crane,D.D., Steele-Mortimer,O., Kari,L., McClarty,G., and Caldwell,H.D. (2005). Chlamydial IFN-gamma immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 10658-10663.
- Nelson,M.M., Jones,A.R., Carmen,J.C., Sinai,A.P., Burchmore,R., and Wastling,J.M. (2008). Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* *76*, 828-844.
- Netherton,C.L., Simpson,J., Haller,O., Wileman,T.E., Takamatsu,H.H., Monaghan,P., and Taylor,G. (2009). Inhibition of a large double-stranded DNA virus by MxA protein. *J. Virol.* *83*, 2310-2320.
- Neun,R., Richter,M.F., Staeheli,P., and Schwemmler,M. (1996). GTPase properties of the interferon-induced human guanylate-binding protein 2. *FEBS Lett.* *390*, 69-72.
- Ng,V.H., Cox,J.S., Sousa,A.O., MacMicking,J.D., and McKinney,J.D. (2004). Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol. Microbiol.* *52*, 1291-1302.
- Nguyen,T.T., Hu,Y., Widney,D.P., Mar,R.A., and Smith,J.B. (2002). Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J. Interferon Cytokine Res.* *22*, 899-909.
- Nicholls,A., Sharp,K.A., and Honig,B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* *11*, 281-296.
- Nicolet,C.M. and Paulnock,D.M. (1994). Promoter analysis of an interferon-inducible gene associated with macrophage activation. *J. Immunol.* *152*, 153-162.

- Niemann,H.H., Knetsch,M.L., Scherer,A., Manstein,D.J., and Kull,F.J. (2001). Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J.* *20*, 5813-5821.
- Nishikawa,Y., Kawase,O., Vielemeyer,O., Suzuki,H., Joiner,K.A., Xuan,X., and Nagasawa,H. (2007). *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. *Parasite Immunol.* *29*, 375-385.
- Obar,R.A., Collins,C.A., Hammarback,J.A., Shpetner,H.S., and Vallee,R.B. (1990). Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* *347*, 256-261.
- Odberg-Ferragut,C., Soete,M., Engels,A., Samyn,B., Loyens,A., Van Beeumen,J., Camus,D., and Dubremetz,J.F. (1996). Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* *82*, 237-244.
- Oh,P., McIntosh,D.P., and Schnitzer,J.E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* *141*, 101-114.
- Okamoto,P.M., Tripet,B., Litowski,J., Hodges,R.S., and Vallee,R.B. (1999). Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J. Biol. Chem.* *274*, 10277-10286.
- Olszewski,M.A., Gray,J., and Vestal,D.J. (2006). In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J. Interferon Cytokine Res.* *26*, 328-352.
- Ong,Y.C., Reese,M.L., and Boothroyd,J.C. (2010). *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J. Biol. Chem.* *285*, 28731-28740.
- Orange,J.S., Wang,B., Terhorst,C., and Biron,C.A. (1995). Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* *182*, 1045-1056.
- Orth,J.D. and McNiven,M.A. (2003). Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 31-39.
- Otero,A.D. (1990). Transphosphorylation and G protein activation. *Biochem. Pharmacol.* *39*, 1399-1404.
- Ottenhoff,T.H., Verreck,F.A., Lichtenauer-Kaligis,E.G., Hoeve,M.A., Sanal,O., and van Dissel,J.T. (2002). Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat. Genet.* *32*, 97-105.
- Pai,E.F., Kabsch,W., Krengel,U., Holmes,K.C., John,J., and Wittinghofer,A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* *341*, 209-214.

- Paludan,S.R. (2000). Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *J. Leukoc. Biol.* *67*, 18-25.
- Papic,N., Hunn,J.P., Pawlowski,N., Zerrahn,J., and Howard,J.C. (2008). Inactive and active states of the interferon-inducible resistance GTPase, Irga6, in vivo. *J. Biol. Chem.* *283*, 32143-32151.
- Parmley,S.F., Gross,U., Sucharczuk,A., Windeck,T., Sgarlato,G.D., and Remington,J.S. (1994). Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* *80*, 293-301.
- Parmley,S.F., Weiss,L.M., and Yang,S. (1995). Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* *73*, 253-257.
- Pavlovic,J., Haller,O., and Staeheli,P. (1992). Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J. Virol.* *66*, 2564-2569.
- Pavlovic,J., Zurcher,T., Haller,O., and Staeheli,P. (1990). Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J. Virol.* *64*, 3370-3375.
- Pawlowski,N., Khaminets,A., Hunn,J.P., Papic,N., Schmidt,A., Uthaiyah,R.C., Lange,R., Vopper,G., Martens,S., Wolf,E., and Howard,J.C. (2011). The activation mechanism of Irga6, an interferon-inducible GTPase contributing to mouse resistance against *Toxoplasma gondii*. *BMC. Biol.* *9*, 7.
- Payne,T.M., Molestina,R.E., and Sinai,A.P. (2003). Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J. Cell Sci.* *116*, 4345-4358.
- Perry,L.L., Su,H., Feilzer,K., Messer,R., Hughes,S., Whitmire,W., and Caldwell,H.D. (1999). Differential sensitivity of distinct *Chlamydia trachomatis* isolates to IFN-gamma-mediated inhibition. *J. Immunol.* *162*, 3541-3548.
- Pestka,S., Krause,C.D., and Walter,M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* *202*, 8-32.
- Pfefferkorn,E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *81*, 908-912.
- Pfefferkorn,E.R. and Pfefferkorn,L.C. (1977). Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J. Protozool.* *24*, 449-453.
- Phelps,E.D., Sweeney,K.R., and Blader,I.J. (2008). *Toxoplasma gondii* rhoptry discharge correlates with activation of the early growth response 2 host cell transcription factor. *Infect. Immun.* *76*, 4703-4712.
- Pifer,R. and Yarovinsky,F. (2011). Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends Parasitol.* *27*, 388-393.

- Pinon, J.M., Dumon, H., Chemla, C., Franck, J., Petersen, E., Lebech, M., Zufferey, J., Bessieres, M.H., Marty, P., Holliman, R., Johnson, J., Luyasu, V., Lecolier, B., Guy, E., Joynson, D.H., Decoster, A., Enders, G., Pelloux, H., and Candolfi, E. (2001). Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 2267-2271.
- Pitossi, F., Blank, A., Schroder, A., Schwarz, A., Hussi, P., Schwemmler, M., Pavlovic, J., and Staeheli, P. (1993). A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J. Virol.* *67*, 6726-6732.
- Platanias, L.C. (2005). Introduction: interferon signals: what is classical and what is nonclassical? *J. Interferon Cytokine Res.* *25*, 732.
- Pober, J.S. and Cotran, R.S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev.* *70*, 427-451.
- Pollard, A.M., Onatolu, K.N., Hiller, L., Haldar, K., and Knoll, L.J. (2008). Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* *76*, 103-110.
- Ponten, A., Sick, C., Weeber, M., Haller, O., and Kochs, G. (1997). Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J. Virol.* *71*, 2591-2599.
- Powers, S., O'Neill, K., and Wigler, M. (1989). Dominant yeast and mammalian RAS mutants that interfere with the CDC25-dependent activation of wild-type RAS in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *9*, 390-395.
- Praefcke, G. J. Das humane Guanylat-bindende Protein 1: Modell oder Sonderfall der Dynamin-verwandten GTP-bindenden Proteine. 2001.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Praefcke, G.J., Geyer, M., Schwemmler, M., Robert, K.H., and Herrmann, C. (1999). Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J. Mol. Biol.* *292*, 321-332.
- Praefcke, G.J., Kloep, S., Bensch, U., Lilie, H., Prakash, B., and Herrmann, C. (2004). Identification of residues in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* *344*, 257-269.
- Praefcke, G.J. and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 133-147.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2000a). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* *403*, 567-571.
- Prakash, B., Renault, L., Praefcke, G.J., Herrmann, C., and Wittinghofer, A. (2000b). Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *EMBO J.* *19*, 4555-4564.

- Prejean,C. and Colamonici,O.R. (2000). Role of the cytoplasmic domains of the type I interferon receptor subunits in signaling. *Semin. Cancer Biol.* *10*, 83-92.
- Prive,G.G., Milburn,M.V., Tong,L., de Vos,A.M., Yamaizumi,Z., Nishimura,S., and Kim,S.H. (1992). X-ray crystal structures of transforming p21 ras mutants suggest a transition-state stabilization mechanism for GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 3649-3653.
- Pucadyil,T.J. and Schmid,S.L. (2009). Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* *325*, 1217-1220.
- Radhakrishna,H., Klausner,R.D., and Donaldson,J.G. (1996). Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J. Cell Biol.* *134*, 935-947.
- Ramachandran,R. and Schmid,S.L. (2008). Real-time detection reveals that effectors couple dynamin's GTP-dependent conformational changes to the membrane. *EMBO J.* *27*, 27-37.
- Ramana,C.V., Gil,M.P., Schreiber,R.D., and Stark,G.R. (2002). Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol.* *23*, 96-101.
- Rasmussen,R.K., Rusak,J., Price,G., Robinson,P.J., Simpson,R.J., and Dorow,D.S. (1998). Mixed-lineage kinase 2-SH3 domain binds dynamin and greatly enhances activation of GTPase by phospholipid. *Biochem. J.* *335 ( Pt 1)*, 119-124.
- Reichert,M., Stertz,S., Krijnse-Locker,J., Haller,O., and Kochs,G. (2004). Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. *Traffic.* *5*, 772-784.
- Reid,T.S., Terry,K.L., Casey,P.J., and Beese,L.S. (2004). Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J. Mol. Biol.* *343*, 417-433.
- Reiner,S.L. and Locksley,R.M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* *13*, 151-177.
- Reis e Sousa, Hieny,S., Scharon-Kersten,T., Jankovic,D., Charest,H., Germain,R.N., and Sher,A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* *186*, 1819-1829.
- Renart,J. and Sandoval,I.V. (1984). Western blots. *Methods Enzymol.* *104*, 455-460.
- Richter,M.F., Schwemmle,M., Herrmann,C., Wittinghofer,A., and Staeheli,P. (1995). Interferon-induced MxA protein. GTP binding and GTP hydrolysis properties. *J. Biol. Chem.* *270*, 13512-13517.
- Ringstad,N., Nemoto,Y., and de Camilli,P. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 8569-8574.

- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S.J., and Smerdon, S.J. (1997a). Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature* *388*, 693-697.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Smerdon, S.J., and Gamblin, S.J. (1997b). Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* *389*, 758-762.
- Robben, P.M., Mordue, D.G., Truscott, S.M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L.D. (2004). Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.* *172*, 3686-3694.
- Robinson, P.J. (1991). The role of protein kinase C and its neuronal substrates dephosphin, B-50, and MARCKS in neurotransmitter release. *Mol. Neurobiol.* *5*, 87-130.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Bastiaens, P.I. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* *307*, 1746-1752.
- Rositer, H., van Reijssen, F., Mudde, G.C., Kalthoff, F., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Picker, L.J., and Kupper, T.S. (1994). Skin disease-related T cells bind to endothelial selectins: expression of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding. *Eur. J. Immunol.* *24*, 205-210.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Coller, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., and Boothroyd, J.C. (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* *314*, 1780-1783.
- Saeij, J.P., Coller, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., and Boothroyd, J.C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* *445*, 324-327.
- Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.I., Driscoll, P.C., Waterfield, M.D., and Panayotou, G. (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* *15*, 6241-6250.
- Santiago, H.C., Feng, C.G., Bafica, A., Roffe, E., Arantes, R.M., Cheever, A., Taylor, G., Vieira, L.Q., Aliberti, J., Gazzinelli, R.T., and Sher, A. (2005). Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. *J. Immunol.* *175*, 8165-8172.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 430-434.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., and Sher, A. (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* *168*, 5997-6001.

- Scharton-Kersten, T.M., Wynn, T.A., Denkers, E.Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R.T., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J. Immunol.* *157*, 4045-4054.
- Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J., and Sher, A. (1997). Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* *185*, 1261-1273.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., and Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* *277*, 333-338.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., and Wittinghofer, A. (1998). GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 257-262.
- Schmidt, G., Lenzen, C., Simon, I., Deuter, R., Cool, R.H., Goody, R.S., and Wittinghofer, A. (1996). Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21ras from guanosine to xanthosine nucleotides. *Oncogene* *12*, 87-96.
- Schnoor, M., Betanzos, A., Weber, D.A., and Parkos, C.A. (2009). Guanylate-binding protein-1 is expressed at tight junctions of intestinal epithelial cells in response to interferon-gamma and regulates barrier function through effects on apoptosis. *Mucosal. Immunol.* *2*, 33-42.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 163-189.
- Schumacher, B. and Staeheli, P. (1998). Domains mediating intramolecular folding and oligomerization of MxA GTPase. *J. Biol. Chem.* *273*, 28365-28370.
- Schumacher, M.A., Bashor, C.J., Song, M.H., Otsu, K., Zhu, S., Parry, R.J., Ullman, B., and Brennan, R.G. (2002). The structural mechanism of GTP stabilized oligomerization and catalytic activation of the *Toxoplasma gondii* uracil phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 78-83.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J., and Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 509-513.
- Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H.R., and Wittinghofer, A. (1995). Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* *2*, 36-44.
- Schwemmler, M., Kaspers, B., Irion, A., Staeheli, P., and Schultz, U. (1996). Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines. *J. Biol. Chem.* *271*, 10304-10308.
- Schwemmler, M., Richter, M.F., Herrmann, C., Nassar, N., and Staeheli, P. (1995). Unexpected structural requirements for GTPase activity of the interferon-induced MxA protein. *J. Biol. Chem.* *270*, 13518-13523.



- Schwemmler, M. and Staeheli, P. (1994). The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J. Biol. Chem.* *269*, 11299-11305.
- Scrima, A. and Wittinghofer, A. (2006). Dimerisation-dependent GTPase reaction of MnmE: how potassium acts as GTPase-activating element. *EMBO J.* *25*, 2940-2951.
- Seabra, M.C. and James, G.L. (1998). Prenylation assays for small GTPases. *Methods Mol. Biol.* *84*, 251-260.
- Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., and Fazekas de St, G.B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* *176*, 1091-1098.
- Seedorf, K., Kostka, G., Lammers, R., Bashkin, P., Daly, R., Burgess, W.H., van der Bliek, A.M., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1994). Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C gamma and GRB-2. *J. Biol. Chem.* *269*, 16009-16014.
- Sehgal, A., Bettioli, S., Pypaert, M., Wenk, M.R., Kaasch, A., Blader, I.J., Joiner, K.A., and Coppens, I. (2005). Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic*. *6*, 1125-1141.
- Sever, S., Damke, H., and Schmid, S.L. (2000). Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* *150*, 1137-1148.
- Sever, S., Muhlberg, A.B., and Schmid, S.L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* *398*, 481-486.
- Shan, S.O., Schmid, S.L., and Zhang, X. (2009). Signal recognition particle (SRP) and SRP receptor: a new paradigm for multistate regulatory GTPases. *Biochemistry* *48*, 6696-6704.
- Shapira, S., Harb, O.S., Margarit, J., Matrajt, M., Han, J., Hoffmann, A., Freedman, B., May, M.J., Roos, D.S., and Hunter, C.A. (2005). Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* *118*, 3501-3508.
- Shenoy, A.R., Kim, B.H., Choi, H.P., Matsuzawa, T., Tiwari, S., and MacMicking, J.D. (2007). Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families. *Immunobiology* *212*, 771-784.
- Shenoy, A.R., Wellington, D.A., Kumar, P., Kassa, H., Booth, C.J., Cresswell, P., and MacMicking, J.D. (2012). GBP5 Promotes NLRP3 Inflammasome Assembly and Immunity in Mammals. *Science*.
- Sher, A. and Coffman, R.L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 385-409.
- Shotland, Y., Kramer, H., and Groisman, E.A. (2003). The *Salmonella* SpiC protein targets the mammalian Hook3 protein function to alter cellular trafficking. *Mol. Microbiol.* *49*, 1565-1576.

- Shpetner,H.S., Herskovits,J.S., and Vallee,R.B. (1996). A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits. *J. Biol. Chem.* *271*, 13-16.
- Shpetner,H.S. and Vallee,R.B. (1989). Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* *59*, 421-432.
- Shpetner,H.S. and Vallee,R.B. (1992). Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* *355*, 733-735.
- Shuman,S. (1991). Site-specific interaction of vaccinia virus topoisomerase I with duplex DNA. Minimal DNA substrate for strand cleavage in vitro. *J. Biol. Chem.* *266*, 20576-20577.
- Shuman,S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* *269*, 32678-32684.
- Shupliakov,O., Low,P., Grabs,D., Gad,H., Chen,H., David,C., Takei,K., de Camilli,P., and Brodin,L. (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* *276*, 259-263.
- Sibley,L.D. (1993). Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. *Semin. Cell Biol.* *4*, 335-344.
- Sibley,L.D. and Ajioka,J.W. (2008). Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.* *62*, 329-351.
- Sibley,L.D. and Andrews,N.W. (2000). Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic.* *1*, 100-106.
- Sibley,L.D. and Boothroyd,J.C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* *359*, 82-85.
- Sibley,L.D., Niesman,I.R., Parmley,S.F., and Cesbron-Delauw,M.F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* *108 ( Pt 4)*, 1669-1677.
- Siebenlist,U., Franzoso,G., and Brown,K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol.* *10*, 405-455.
- Sigal,I.S., Gibbs,J.B., D'Alonzo,J.S., Temeles,G.L., Wolanski,B.S., Socher,S.H., and Scolnick,E.M. (1986). Mutant ras-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 952-956.
- Simon,A., Fah,J., Haller,O., and Staeheli,P. (1991). Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. *J. Virol.* *65*, 968-971.
- Sims,S.H., Cha,Y., Romine,M.F., Gao,P.Q., Gottlieb,K., and Deisseroth,A.B. (1993). A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol. Cell Biol.* *13*, 690-702.
- Sinai,A.P. and Joiner,K.A. (1997). Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu. Rev. Microbiol.* *51*, 415-462.

- Sinai, A.P., Payne, T.M., Carmen, J.C., Hardi, L., Watson, S.J., and Molestina, R.E. (2004). Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* *34*, 381-391.
- Sinai, A.P., Webster, P., and Joiner, K.A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell Sci.* *110* (Pt 17), 2117-2128.
- Sinensky, M. and Lutz, R.J. (1992). The prenylation of proteins. *Bioessays* *14*, 25-31.
- Singer, D.S. and Maguire, J.E. (1990). Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit. Rev. Immunol.* *10*, 235-257.
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A., and Deretic, V. (2006). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* *313*, 1438-1441.
- Singh, S.B., Ornatowski, W., Vergne, I., Naylor, J., Delgado, M., Roberts, E., Ponpuak, M., Master, S., Pilli, M., White, E., Komatsu, M., and Deretic, V. (2010). Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat. Cell Biol.* *12*, 1154-1165.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Newman-Smith, E.D., Pishvae, B., and van der Blik, A.M. (1999). A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J. Biol. Chem.* *274*, 14942-14947.
- Smith, J.E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* *25*, 1301-1309.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76-85.
- Snapper, C.M., Rosas, F., Moorman, M.A., Jin, L., Shanebeck, K., Klinman, D.M., Kehry, M.R., Mond, J.J., and Maliszewski, C.R. (1996). IFN-gamma is a potent inducer of Ig secretion by sort-purified murine B cells activated through the mIg, but not the CD40, signaling pathway. *Int. Immunol.* *8*, 877-885.
- Snapper, C.M., Yamaguchi, H., Moorman, M.A., Sneed, R., Smoot, D., and Mond, J.J. (1993). Natural killer cells induce activated murine B cells to secrete Ig. *J. Immunol.* *151*, 5251-5260.
- Soete, M., Camus, D., and Dubremetz, J.F. (1994). Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Exp. Parasitol.* *78*, 361-370.
- Song, B.D., Leonard, M., and Schmid, S.L. (2004a). Dynamin GTPase domain mutants that differentially affect GTP binding, GTP hydrolysis, and clathrin-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 40431-40436.
- Song, B.D. and Schmid, S.L. (2003). A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* *42*, 1369-1376.

- Song, B.D., Yasar, D., and Schmid, S.L. (2004b). An assembly-incompetent mutant establishes a requirement for dynamin self-assembly in clathrin-mediated endocytosis in vivo. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2243-2252.
- Song, M.M. and Shuai, K. (1998). The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J. Biol. Chem.* *273*, 35056-35062.
- Sorace, J.M., Johnson, R.J., Howard, D.L., and Drysdale, B.E. (1995). Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J. Leukoc. Biol.* *58*, 477-484.
- Spear, W., Chan, D., Coppens, I., Johnson, R.S., Giaccia, A., and Blader, I.J. (2006). The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for *Toxoplasma gondii* growth and survival at physiological oxygen levels. *Cell Microbiol.* *8*, 339-352.
- Staehele, P. and Haller, O. (1985). Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice. *Mol. Cell Biol.* *5*, 2150-2153.
- Staehele, P., Haller, O., Boll, W., LINDENMANN, J., and Weissmann, C. (1986). Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* *44*, 147-158.
- Staehele, P., Yu, Y.X., Grob, R., and Haller, O. (1989). A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx. *Mol. Cell Biol.* *9*, 3117-3121.
- Steinfeldt, T., Konen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L.D., Hunn, J.P., and Howard, J.C. (2010). Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol.* *8*, e1000576.
- Stickney, J.T. and Buss, J.E. (2000). Murine guanylate-binding protein: incomplete geranylgeranyl isoprenoid modification of an interferon-gamma-inducible guanosine triphosphate-binding protein. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2191-2200.
- Stowell, M.H., Marks, B., Wigge, P., and McMahon, H.T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* *1*, 27-32.
- Straub, K.W., Cheng, S.J., Sohn, C.S., and Bradley, P.J. (2009). Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell Microbiol.* *11*, 590-603.
- Su, C., Howe, D.K., Dubey, J.P., Ajioka, J.W., and Sibley, L.D. (2002). Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 10753-10758.
- Subauste, C.S. (2009). Autophagy as an antimicrobial strategy. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* *7*, 743-752.

- Sun, Y.J., Forouhar, F., Li Hm, H.M., Tu, S.L., Yeh, Y.H., Kao, S., Shr, H.L., Chou, C.C., Chen, C., and Hsiao, C.D. (2002). Crystal structure of pea Toc34, a novel GTPase of the chloroplast protein translocon. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 95-100.
- Suzuki, Y. (2002). Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* *186 Suppl 2*, S234-S240.
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D., and Remington, J.S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* *240*, 516-518.
- Sweitzer, S.M. and Hinshaw, J.E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* *93*, 1021-1029.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., and Glimcher, L.H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 713-758.
- Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L., and de Camilli, P. (1996). The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J. Cell Biol.* *133*, 1237-1250.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., and Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* *361*, 79-82.
- Tannenbaum, C.S., Major, J.A., and Hamilton, T.A. (1993). IFN-gamma and lipopolysaccharide differentially modulate expression of tumor necrosis factor receptor mRNA in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* *151*, 6833-6839.
- Tatake, R.J. and Zeff, R.A. (1993). Regulated expression of the major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *203*, 405-417.
- Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., and Kelvin, D.J. (1993). Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* *260*, 355-358.
- Taylor, G.A. (2007). IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* *9*, 1099-1107.
- Taylor, G.A., Collazo, C.M., Yap, G.S., Nguyen, K., Gregorio, T.A., Taylor, L.S., Eagleson, B., Secret, L., Southon, E.A., Reid, S.W., Tessarollo, L., Bray, M., McVicar, D.W., Komschlies, K.L., Young, H.A., Biron, C.A., Sher, A., and Vande Woude, G.F. (2000). Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 751-755.
- Taylor, G.A., Feng, C.G., and Sher, A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 100-109.
- Taylor, G.A., Jeffers, M., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Woude, G.F. (1996). Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *J. Biol. Chem.* *271*, 20399-20405.

- Taylor,G.A., Stauber,R., Rulong,S., Hudson,E., Pei,V., Pavlakis,G.N., Resau,J.H., and Vande Woude,G.F. (1997). The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. *J. Biol. Chem.* *272*, 10639-10645.
- Taylor,S., Barragan,A., Su,C., Fux,B., Fentress,S.J., Tang,K., Beatty,W.L., Hajj,H.E., Jerome,M., Behnke,M.S., White,M., Wootton,J.C., and Sibley,L.D. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* *314*, 1776-1780.
- Tenter,A.M., Heckeroth,A.R., and Weiss,L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* *30*, 1217-1258.
- Tietzel,I., El Haibi,C., and Carabeo,R.A. (2009). Human guanylate binding proteins potentiate the anti-chlamydia effects of interferon-gamma. *PLoS. One.* *4*, e6499.
- Tiwari,S., Choi,H.P., Matsuzawa,T., Pypaert,M., and MacMicking,J.D. (2009). Targeting of the GTPase *Irgm1* to the phagosomal membrane via *PtdIns(3,4)P(2)* and *PtdIns(3,4,5)P(3)* promotes immunity to mycobacteria. *Nat. Immunol.* *10*, 907-917.
- Towbin,H., Staehelin,T., and 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*, 4350-4354.
- Traver,M.K., Henry,S.C., Cantillana,V., Oliver,T., Hunn,J.P., Howard,J.C., Beer,S., Pfeffer,K., Coers,J., and Taylor,G.A. (2011). Immunity-related gtpase M (IRGM) proteins influence the localization of guanylate-binding protein 2 (GBP2) by modulating macroautophagy. *J. Biol. Chem.*
- Trinchieri,G. (1995). Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together? *Am. J. Pathol.* *147*, 1534-1538.
- Tuma,P.L. and Collins,C.A. (1994). Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J. Biol. Chem.* *269*, 30842-30847.
- Tuma,P.L. and Collins,C.A. (1995). Dynamin forms polymeric complexes in the presence of lipid vesicles. Characterization of chemically cross-linked dynamin molecules. *J. Biol. Chem.* *270*, 26707-26714.
- Tuma,P.L., Stachniak,M.C., and Collins,C.A. (1993). Activation of dynamin GTPase by acidic phospholipids and endogenous rat brain vesicles. *J. Biol. Chem.* *268*, 17240-17246.
- Uthaiyah,R.C., Praefcke,G.J., Howard,J.C., and Herrmann,C. (2003). IIGP1, an interferon-gamma-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. *J. Biol. Chem.* *278*, 29336-29343.
- Vallis,Y., Wigge,P., Marks,B., Evans,P.R., and McMahon,H.T. (1999). Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* *9*, 257-260.
- van Dam,E.M. and Stoorvogel,W. (2002). Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles. *Mol. Biol. Cell* *13*, 169-182.

- Varinou,L., Ramsauer,K., Karaghiosoff,M., Kolbe,T., Pfeffer,K., Muller,M., and Decker,T. (2003). Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity*. *19*, 793-802.
- Vestal,D.J. (2005). The guanylate-binding proteins (GBPs): proinflammatory cytokine-induced members of the dynamin superfamily with unique GTPase activity. *J. Interferon Cytokine Res.* *25*, 435-443.
- Vestal,D.J., Buss,J.E., Kelner,G.S., Maciejewski,D., Asundi,V.K., and Maki,R.A. (1996). Rat p67 GBP is induced by interferon-gamma and isoprenoid-modified in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *224*, 528-534.
- Vestal,D.J., Buss,J.E., McKercher,S.R., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Kelner,G.S., Asundi,V.K., and Maki,R.A. (1998). Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* *18*, 977-985.
- Vestal,D.J., Gorbacheva,V.Y., and Sen,G.C. (2000). Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J. Interferon Cytokine Res.* *20*, 991-1000.
- Vestal,D.J. and Jeyaratnam,J.A. (2011). The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. *J. Interferon Cytokine Res.* *31*, 89-97.
- Vetter,I.R. and Wittinghofer,A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* *294*, 1299-1304.
- Via,A., Ferre,F., Brannetti,B., Valencia,A., and Helmer-Citterich,M. (2000). Three-dimensional view of the surface motif associated with the P-loop structure: cis and trans cases of convergent evolution. *J. Mol. Biol.* *303*, 455-465.
- Vidal,S., Tremblay,M.L., Govoni,G., Gauthier,S., Sebastiani,G., Malo,D., Skamene,E., Olivier,M., Jothy,S., and Gros,P. (1995). The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J. Exp. Med.* *182*, 655-666.
- Vieira,O.V., Botelho,R.J., Rameh,L., Brachmann,S.M., Matsuo,T., Davidson,H.W., Schreiber,A., Backer,J.M., Cantley,L.C., and Grinstein,S. (2001). Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.* *155*, 19-25.
- Virreira,W.S., Niedelman,W., Jensen,K.D., Rosowski,E.E., Julien,L., Spooner,E., Caradonna,K., Burleigh,B.A., Saeij,J.P., Ploegh,H.L., and Fricke,E.M. (2011). Determinants of GBP recruitment to *Toxoplasma gondii* vacuoles and the parasitic factors that control it. *PLoS One.* *6*, e24434.
- Vopel,T., Kunzelmann,S., and Herrmann,C. (2009). Nucleotide dependent cysteine reactivity of hGBP1 uncovers a domain movement during GTP hydrolysis. *FEBS Lett.* *583*, 1923-1927.

- Vopel,T., Syguda,A., Britzen-Laurent,N., Kunzelmann,S., Ludemann,M.B., Dovengerds,C., Sturzl,M., and Herrmann,C. (2010). Mechanism of GTPase-activity-induced self-assembly of human guanylate binding protein 1. *J. Mol. Biol.* *400*, 63-70.
- Wagner,B., Burton,A., and Ainsworth,D. (2010). Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet. Res.* *41*, 47.
- Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J., and Gay,N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* *1*, 945-951.
- Walker,M.E., Hjort,E.E., Smith,S.S., Tripathi,A., Hornick,J.E., Hinchcliffe,E.H., Archer,W., and Hager,K.M. (2008). *Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells. *Microbes. Infect.* *10*, 1440-1449.
- Wang,Z.E., Reiner,S.L., Zheng,S., Dalton,D.K., and Locksley,R.M. (1994). CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* *179*, 1367-1371.
- Warnock,D.E., Hinshaw,J.E., and Schmid,S.L. (1996). Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J. Biol. Chem.* *271*, 22310-22314.
- Wehner,M. and Herrmann,C. (2010). Biochemical properties of the human guanylate binding protein 5 and a tumor-specific truncated splice variant. *FEBS J.* *277*, 1597-1605.
- Wehner,M., Kunzelmann,S., and Herrmann,C. (2012). The guanine cap of human guanylate-binding protein 1 is responsible for dimerization and self-activation of GTP hydrolysis. *FEBS J.* *279*, 203-210.
- Wei,X.Q., Charles,I.G., Smith,A., Ure,J., Feng,G.J., Huang,F.P., Xu,D., Muller,W., Moncada,S., and Liew,F.Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* *375*, 408-411.
- Weidtkamp-Peters,S., Felekyan,S., Bleckmann,A., Simon,R., Becker,W., Kuhnemuth,R., and Seidel,C.A. (2009). Multiparameter fluorescence image spectroscopy to study molecular interactions. *Photochem. Photobiol. Sci.* *8*, 470-480.
- Weijland,A. and Parmeggiani,A. (1993). Toward a model for the interaction between elongation factor Tu and the ribosome. *Science* *259*, 1311-1314.
- Weinlander,K., Naschberger,E., Lehmann,M.H., Tripal,P., Paster,W., Stockinger,H., Hohenadl,C., and Sturzl,M. (2008). Guanylate binding protein-1 inhibits spreading and migration of endothelial cells through induction of integrin alpha4 expression. *FASEB J.* *22*, 4168-4178.
- Weiss, L. M. and Kim, L. *Toxoplasma gondii*. The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. 2007.
- Ref Type: Serial (Book,Monograph)



- Wenk, M.R. and de Camilli, P. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 8262-8269.
- Wenner, C.A., Guler, M.L., Macatonia, S.E., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1996). Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J. Immunol.* *156*, 1442-1447.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* *118*, 843-846.
- Wheelock, E.F. (1965). Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* *149*, 310-311.
- Wittinghofer, A. (1997). Signaling mechanistics: aluminum fluoride for molecule of the year. *Curr. Biol.* *7*, R682-R685.
- Wittinghofer, A. and Gierschik, P. (2000). Highlight: GTP binding proteins--central regulators in cell biology. *Biol. Chem.* *381*, 355.
- Wolf, A., Cowen, D., and Paige, B.H. (1939). Toxoplasmic encephalomyelitis: III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *Am. J. Pathol.* *15*, 657-694.
- Wolf, P.R. and Ploegh, H.L. (1995). Antigen presentation. DM exchange mechanism. *Nature* *376*, 464-465.
- Wynn, T.A., Nicolet, C.M., and Paulnock, D.M. (1991). Identification and characterization of a new gene family induced during macrophage activation. *J. Immunol.* *147*, 4384-4392.
- Xu, H., Wu, Z.Y., Fang, F., Guo, L., Chen, D., Chen, J.X., Stern, D., Taylor, G.A., Jiang, H., and Yan, S.S. (2010). Genetic deficiency of Irgm1 (LRG-47) suppresses induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting apoptosis of activated CD4+ T cells. *FASEB J.* *24*, 1583-1592.
- Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D.C., Soldati-Favre, D., Horie, K., Takeda, J., and Takeda, K. (2012). A Cluster of Interferon-gamma-Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity*.
- Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., Soldati-Favre, D., and Takeda, K. (2009). A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* *206*, 2747-2760.
- Yamamoto, Y.I., Huber, V., and Hoshino-Shimizu, S. (1997). Identification of *Toxoplasma gondii* antigens involved in the IgM and IgG indirect hemagglutination tests for the diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* *39*, 149-154.
- Yang, L.L., Li, R.M., Pan, X.H., Qian, M., and DU, B. (2012). [Construction of P2Y6 constitutive knock down breast cancer cell line and evaluation of its proliferation]. *Xi. Bao. Yu Fen. Zi. Mian. Yi. Xue. Za Zhi.* *28*, 510-513.

- Yang,S. and Parmley,S.F. (1995). A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase. *Mol. Biochem. Parasitol.* *73*, 291-294.
- Yap,G., Pesin,M., and Sher,A. (2000). Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *165*, 628-631.
- Yap,G.S. and Sher,A. (1999). Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* *189*, 1083-1092.
- Yarovinsky,F., Zhang,D., Andersen,J.F., Bannenberg,G.L., Serhan,C.N., Hayden,M.S., Hieny,S., Sutterwala,F.S., Flavell,R.A., Ghosh,S., and Sher,A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626-1629.
- Yokoyama,K., Goodwin,G.W., Ghomashchi,F., Glomset,J.A., and Gelb,M.H. (1991). A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 5302-5306.
- York,I.A. and Rock,K.L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 369-396.
- Yoshida,A., Koide,Y., Uchijima,M., and Yoshida,T.O. (1994). IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *198*, 857-861.
- You,M., Yu,D.H., and Feng,G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol. Cell Biol.* *19*, 2416-2424.
- Youn,J.H., Nam,H.W., Kim,D.J., Park,Y.M., Kim,W.K., Kim,W.S., and Choi,W.Y. (1991). Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Kisaengchunghak Chapchi* *29*, 121-128.
- Yu,B., Slepak,V.Z., and Simon,M.I. (1997). Characterization of a Goalpha mutant that binds xanthine nucleotides. *J. Biol. Chem.* *272*, 18015-18019.
- Zantl,N., Uebe,A., Neumann,B., Wagner,H., Siewert,J.R., Holzmann,B., Heidecke,C.D., and Pfeffer,K. (1998). Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect. Immun.* *66*, 2300-2309.
- Zerrahn,J., Schaible,U.E., Brinkmann,V., Guhlich,U., and Kaufmann,S.H. (2002). The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum- associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J. Immunol.* *168*, 3428-3436.
- Zhang,F.L. and Casey,P.J. (1996). Influence of metal ions on substrate binding and catalytic activity of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *Biochem. J.* *320 ( Pt 3)*, 925-932.

- Zhang,G. and Tandon,A. (2012). Quantitative assessment on the cloning efficiencies of lentiviral transfer vectors with a unique clone site. *Sci. Rep.* *2*, 415.
- Zhang,H.M., Yuan,J., Cheung,P., Luo,H., Yanagawa,B., Chau,D., Stephan-Tozy,N., Wong,B.W., Zhang,J., Wilson,J.E., McManus,B.M., and Yang,D. (2003). Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J. Biol. Chem.* *278*, 33011-33019.
- Zhang,P. and Hinshaw,J.E. (2001). Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat. Cell Biol.* *3*, 922-926.
- Zhang,X.F., Settleman,J., Kyriakis,J.M., Takeuchi-Suzuki,E., Elledge,S.J., Marshall,M.S., Bruder,J.T., Rapp,U.R., and Avruch,J. (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* *364*, 308-313.
- Zhao,Y.O., Khaminets,A., Hunn,J.P., and Howard,J.C. (2009a). Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN $\gamma$ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS. Pathog.* *5*, e1000288.
- Zhao,Y.O., Konen-Waisman,S., Taylor,G.A., Martens,S., and Howard,J.C. (2010). Localisation and mislocalisation of the interferon-inducible immunity-related GTPase, Irgm1 (LRG-47) in mouse cells. *PLoS. One.* *5*, e8648.
- Zhao,Y.O., Rohde,C., Lilue,J.T., Konen-Waisman,S., Khaminets,A., Hunn,J.P., and Howard,J.C. (2009b). *Toxoplasma gondii* and the Immunity-Related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *104*, 234-240.
- Zhao,Z., Fux,B., Goodwin,M., Dunay,I.R., Strong,D., Miller,B.C., Cadwell,K., Delgado,M.A., Ponpuak,M., Green,K.G., Schmidt,R.E., Mizushima,N., Deretic,V., Sibley,L.D., and Virgin,H.W. (2008). Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host. Microbe* *4*, 458-469.
- Zheng,J., Cahill,S.M., Lemmon,M.A., Fushman,D., Schlessinger,J., and Cowburn,D. (1996). Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J. Mol. Biol.* *255*, 14-21.
- Zhong,J.M., Chen-Hwang,M.C., and Hwang,Y.W. (1995). Switching nucleotide specificity of Ha-Ras p21 by a single amino acid substitution at aspartate 119. *J. Biol. Chem.* *270*, 10002-10007.
- Zhou,X.W., Kafsack,B.F., Cole,R.N., Beckett,P., Shen,R.F., and Carruthers,V.B. (2005). The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. *J. Biol. Chem.* *280*, 34233-34244.
- Zhu,P.P., Patterson,A., Lavoie,B., Stadler,J., Shoeb,M., Patel,R., and Blackstone,C. (2003). Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *J. Biol. Chem.* *278*, 49063-49071.
- Zimmermann,P., Manz,B., Haller,O., Schwemmler,M., and Kochs,G. (2011). The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses. *J. Virol.* *85*, 8133-8140.

- Zimmermann,S., Murray,P.J., Heeg,K., and Dalpke,A.H. (2006). Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J. Immunol.* *176*, 1840-1847.
- Zinkernagel,A.S., Johnson,R.S., and Nizet,V. (2007). Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J. Mol. Med. (Berl)* *85*, 1339-1346.
- Zufferey,R., Dull,T., Mandel,R.J., Bukovsky,A., Quiroz,D., Naldini,L., and Trono,D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* *72*, 9873-9880.
- Zurcher,T., Pavlovic,J., and Staeheli,P. (1992a). Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J.* *11*, 1657-1661.
- Zurcher,T., Pavlovic,J., and Staeheli,P. (1992b). Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus. *J. Virol.* *66*, 5059-5066.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Klaus Pfeffer, für die Bereitstellung eines interessanten Themas, die idealen wissenschaftlichen Bedingungen und für sein Vertrauen.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Dr. Daniel Degrandi für die exzellente Betreuung, für die stete motivierende Unterstützung, Geduld und die unzähligen anregenden Diskussionen richten.

Bei Herrn Prof. Dr. Schmitt möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferats und eine sehr produktive Kollaboration bedanken.

Mein großer Dank geht an Dr. Sander Smits und Dr. Britta Tschapek für die hervorragende Betreuung in Hinblick auf die biochemischen Analysen.

Vielen Dank an Andre Abts und Christian Schwarz für die Mitbetreuung in der Biochemie.

Prof. Dr. Claus Seidel und Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters danke ich für die interessante Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Gerrit Praefcke für die geduldige Einweisung in biochemische Methoden und für die kritische Beurteilung der Daten.

Dankeschön an Dr. Astrid Hoepfner für die Übernahme der Kristallisation von mGBP2.

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft möchte ich ein großes Dankeschön an die AG Pfeffer, die AG Scheu und die Virologen aussprechen.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie für die uneingeschränkte Unterstützung und Fürsprache, für den steten Ansporn und für den Rückhalt in allen Lebenslagen.

Ich möchte die hier vorliegende Arbeit meiner Mutter widmen.



## Anhang

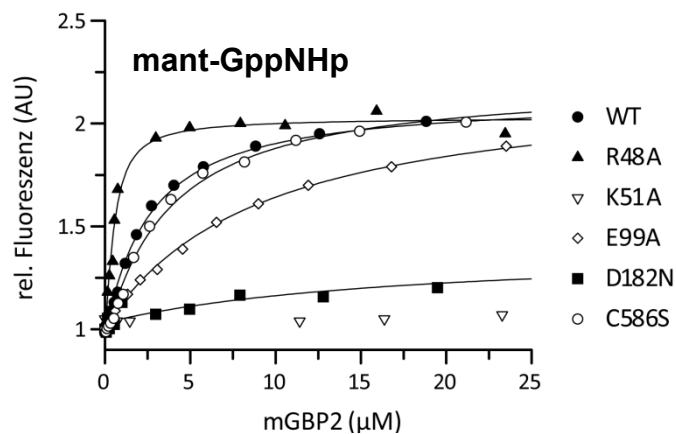


Abb. A: Fluoreszenztitration von mant-GppNHp an mGBP2.

0,5  $\mu\text{M}$  mant-Nukleotid wurden im Puffer D (s. 2.3.1) bei 25°C vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen mGBP2 bis zur Sättigung titriert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 355 nm, die Emissionsmessung bei 448 nm. Die Anpassung einer Wurzelfunktion an die Daten (siehe 2.10.16), die ein binäres Gleichgewicht mit 1:1 Stöchiometrie beschreibt, liefert Dissoziationskonstanten, die in Tab. A gezeigt sind.

Tabelle A: Fluoreszenztitration von mant-GppNHp nach der Bindung an mGBP2 WT und GTPase-Mutanten.  $K_D$  ist die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation. Alle Messungen wurden in 0,5  $\mu\text{M}$  mant-GppNHp im Puffer D (s. 2.3.1) bei 25°C durchgeführt.

Nukleotidbindung	
mant-GppNHp	
	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
WT	$2,35 \pm 0,22$
R48A	$0,295 \pm 0,57$
K51A	> 100
E99A	$8,72 \pm 0,54$
D182N	$17,3 \pm 13,5$
C586S	$3,43 \pm 0,38$

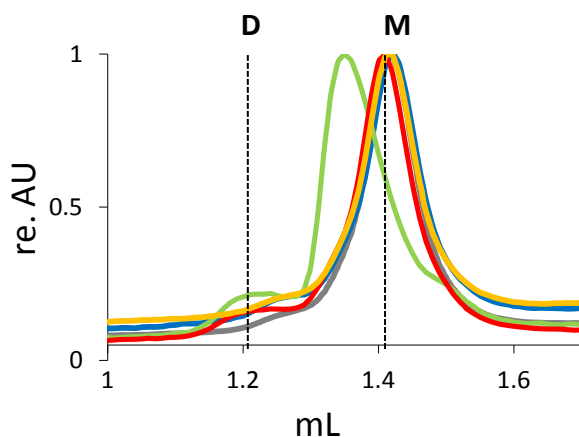
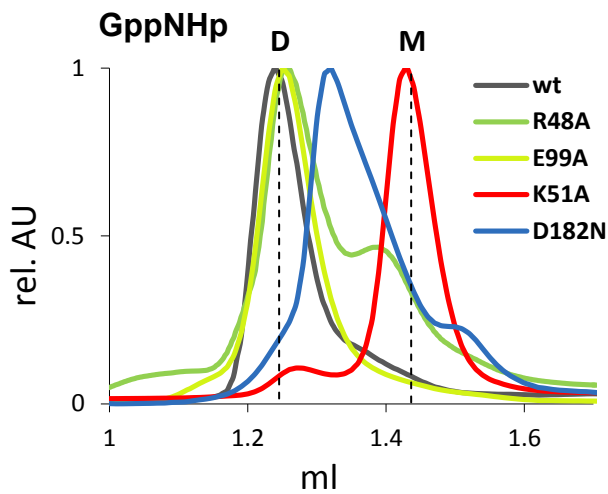


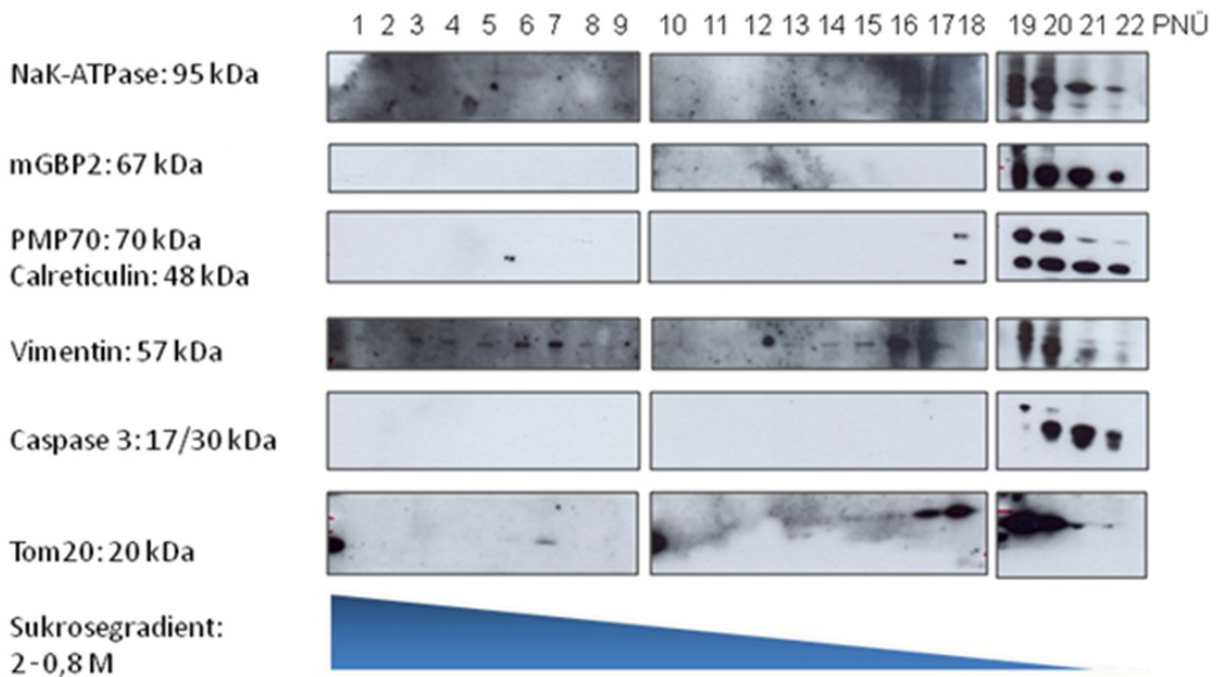
Abb. B: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von K51A-mGBP2.

30  $\mu\text{M}$  K51A-mGBP2 wurden ohne Nukleotid (-) oder mit je 50  $\mu\text{M}$  GTP $\gamma$ S (-), GppNHp (-), GDP (-) oder GMP (-) im Puffer D (s. 2.3.1) 15 min auf Eis vorinkubiert und anschließend auf einer analytischen Größenausschluss-Chromatographiesäule aufgetrennt. Die Mutante eluierte als Monomer.



**Abb. C: Nukleotidabhängige Oligomerisierung von mGBP2-GTPase-Mutanten.**

30  $\mu\text{M}$  mGBP2 wurden mit 5  $\mu\text{M}$  GppNHp im Puffer D (s. 2.3.1) 15 min auf Eis vorinkubiert und anschließend auf einer analytischen Größenausschluss-Chromatographiesäule aufgetrennt. WT eluierte als Dimer, die Punktmutante R48A als ein Gemisch aus Dimer und Monomer, die Punktmutante K51A als Monomer, die Punktmutante E99A als Dimer und die Punktmutante D182N als ein Gemisch aus Dimer und Monomer.



**Abb. D: mGBP2 Verteilung korreliert mit intrazellulären Membranstrukturen in Zellfraktionierung durch den Zuckergradienten.**

Für 16 h mit  $\text{IFN-}\gamma$  behandelte WT MEFs wurden für 15 min mit 300  $\mu\text{M}$   $\text{AIF}_x$  inkubiert in im isotonen Puffer mit 0,8 M Sukrose und 300  $\mu\text{M}$   $\text{AIF}_x$  mechanisch mit einem Zell-Homogenisator lysiert und der postnukleare Überstand (PNU) auf einen 0,8-2 M kontinuierlichen Sukrosegradienten aufgeschichtet. Nach der Ultrazentrifugation bei 261.000g für 16 h bei 4°C wurden 0,5-mL Fraktionen von hohen zu niedrigen Dichten des Gradienten abgenommen (1-22). 30  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Proben wurden auf 4-12% SDS-PAGE Gele geladen, im Western Blot auf eine mit BSA geblockte PMSF-Membran transferiert und in Immunfärbungen nach Lokalisation von mGBP2 gegen Plasmamembran (NaK-ATPase), Peroxisom (PMP70), Intermediärfilament (Vimentin), ER (Calreticulin), Zytosol (Caspase-3) und Mitochondrien (Tom20) untersucht. Späte Fraktionen (18-22) mit der geringsten Dichte enthalten Membranen.





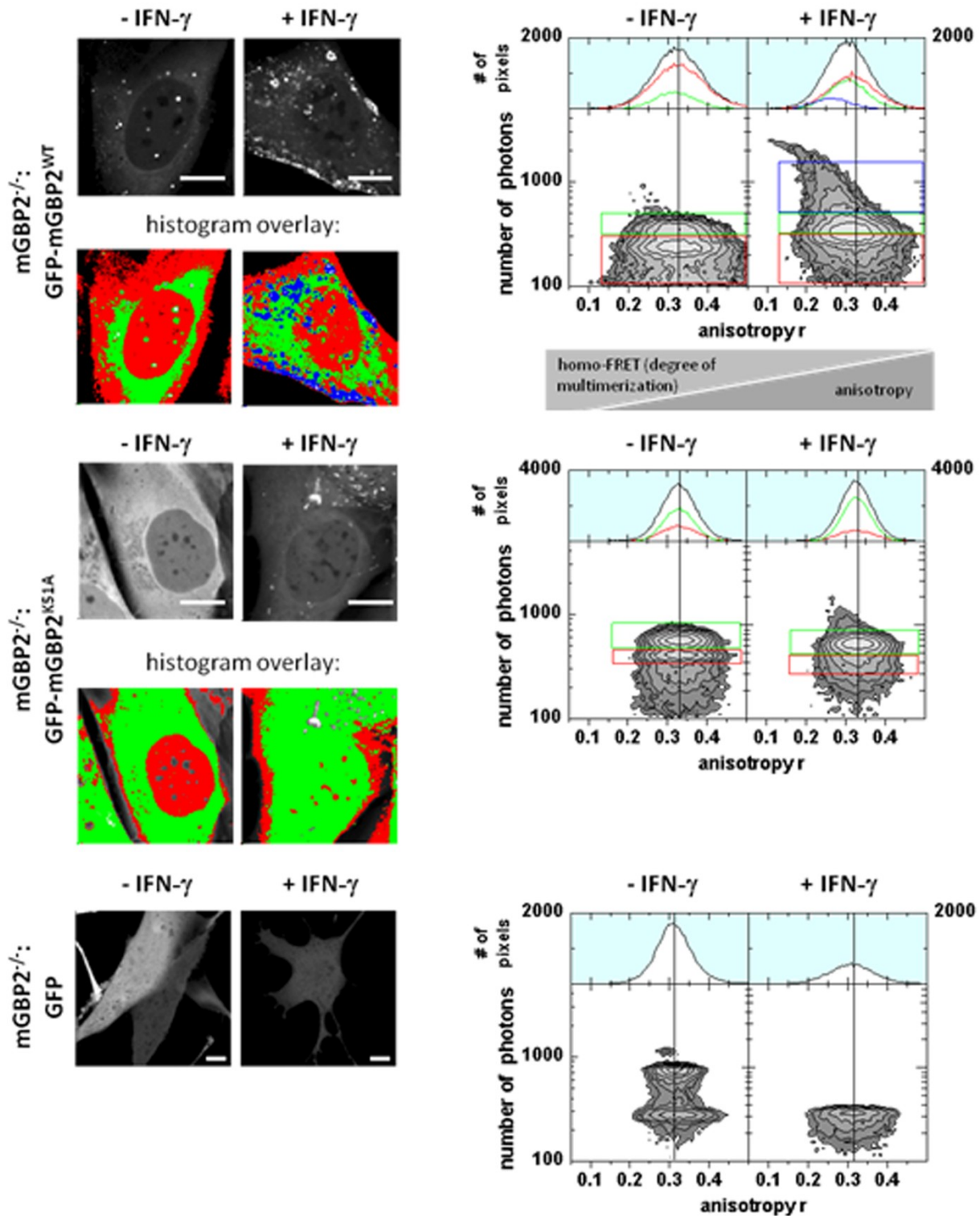


Abb.F: Intrazelluläre Multimerisierung von mGBP2.

Konfokale “steady-state” Fluoreszenz Aufnahmen von lebenden IFN- $\gamma$  stimulierten und unstimulierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, die stabil GFP, GFP-mGBP2-WT oder GFP-K51A-mGBP2 exprimieren. (Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters).

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Außerdem wurde diese Dissertation weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Form bei keiner anderen Institution eingereicht.

Die meisten der für die Anfertigung dieser Arbeit erforderlichen Methoden wurden von der Autorin selbständig durchgeführt.

Folgende Methoden wurden von Kooperationspartnern durchgeführt:

Homo-FRET-Analysen von GFP-mGBP2-WT und Mutanten (Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters, Center of Advanced Imaging, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Kristallisation von mGBP2 (Dr. Astrid Hoepfner, Institut für Biochemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Düsseldorf, den 03.08.2012

Elisabeth Kravets



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Elisabeth Kravets
geboren am	03.05.1983
in	Frunse/Bischkek (Kirgistan)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Wohnsitz	Beckbuschstr. 7, 40474 Düsseldorf

### Bildungsgang

1989-94	Gymnasium, Frunse/Bischkek (Kirgistan)
1995-2003	Gymnasium auf der Gartenstraße, Mönchengladbach
2003	Allgemeine Hochschulreife, erworben am Gymnasium auf der Gartenstraße, Mönchengladbach
10/2003	Beginn des Bachelor Biochemiestudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
8/2006	Beendigung des Biochemiestudiums mit Abschluss: Bachelor of Science
10/2006	Beginn des Master Biochemiestudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
9/2008	Beendigung des Biochemiestudiums mit Abschluss: Master of Science
01/2009	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
12/2012	Beendigung der Doktorarbeit mit Abschluss: Summa cum laude