

# **Funktionelle Charakterisierung der Kokalisation von Guanylat-bindenden Proteinen (GBPs) mit intrazellulären Erregern**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Verena Klümpers**

aus Gronau

Düsseldorf, Oktober 2013



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. Klaus Pfeffer  
Korreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2013



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Immunsystem</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Angeborenes Immunsystem.....	6
1.1.2 Adaptives Immunsystem.....	8
<b>1.2 IFN<math>\gamma</math></b> .....	<b>10</b>
1.2.1 IFN $\gamma$ induzierte Effektormechanismen.....	14
1.2.1.1 p65 murine GBPs.....	15
<b>1.3 <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	<b>18</b>
1.3.1 Lebenszyklus von <i>T. gondii</i> .....	19
1.3.2 Genom und Struktur der Tachyzoiten und Bradyzoiten.....	21
1.3.3 Interaktionen mit dem Wirt.....	22
1.3.3.1 Invasion und Bildung der PV.....	22
1.3.3.2 Die sekretorischen Organellen.....	23
1.3.3.3 Wechselwirkungen zwischen intrazellulären <i>T. gondii</i> und der Wirtszelle.....	24
1.3.3.4 Aktivierung des Immunsystems nach <i>T. gondii</i> Infektion.....	25
<b>1.4 MCMV</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5 Zielsetzung</b> .....	<b>31</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1 Bezugsquellennachweise</b> .....	<b>33</b>
2.1.1 Inhibitoren.....	33
2.1.2 Enzyme.....	33
2.1.3 Antikörper.....	33
2.1.4 Kits und Verbrauchsmaterial.....	35
2.1.5 Geräte.....	36
<b>2.2 Medien und Puffer</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3 Zellkulturmedien</b> .....	<b>38</b>
<b>2.4 Zusätze Zellkultur</b> .....	<b>39</b>

<b>2.5</b>	<b>Medien für die Bakterienkultur.....</b>	<b>40</b>
<b>2.6</b>	<b>Antibiotika.....</b>	<b>40</b>
<b>2.7</b>	<b>Eukaryotische Zellen .....</b>	<b>40</b>
<b>2.8</b>	<b>Bakterienstämme.....</b>	<b>41</b>
<b>2.9</b>	<b>Virenstämme .....</b>	<b>41</b>
<b>2.10</b>	<b>Parasitenstämme .....</b>	<b>41</b>
<b>2.11</b>	<b>Primer.....</b>	<b>41</b>
2.11.1	Primer für das mGBP10-6 Fusionskonstrukt .....	41
2.11.2	Primer für die mGBP6 Mutationen.....	42
2.11.3	Primer für die mGBP10 Mutationen.....	42
2.11.4	Primer für die mGBP2 Mutationen.....	43
2.11.5	Primer für die mGBP6-pWPXL/mCherry Klonierung .....	43
2.11.6	Plasmidvektoren/Ausgangsvektoren.....	43
2.11.7	im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide.....	44
2.11.8	Primer und Sonden für die RT-PCR.....	44
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Kultivierung eukaryotischen Zelllinien.....	44
3.1.2	Kultivierung von <i>T. gondii</i> .....	44
3.1.3	Transfektion von Fibroblasten .....	45
3.1.3.1	Stabile Transduktion mittels Virusüberstand.....	45
3.1.3.2	Transiente Transfektion mittels JetPrime .....	46
3.1.4	In vitro Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	46
3.1.5	Immunfluoreszenzfärbung (IF) .....	46
3.1.6	In vitro Anwendung von Inhibitoren/Chelatoren .....	46
<b>3.2</b>	<b>Selektive Permeabilisierung.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3</b>	<b>Kalzium Depletion .....</b>	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....</b>	<b>48</b>
3.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	48
3.4.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen .....	48
3.4.3	Agarosegelelektrophorese.....	48
3.4.4	Restriktionsanalyse .....	48
3.4.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	49
3.4.6	Mutagenese-PCR .....	49
3.4.7	Quantitative PCR (realtime PCR).....	50
3.4.8	Ligation .....	50
3.4.9	Isolierung von mRNA aus eukaryotischen Zellen.....	51
3.4.10	cDNA-Synthese aus gesamtzellulärer RNA.....	51

3.4.11	Transformation chemokompetenter Bakterien .....	51
<b>3.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>52</b>
3.5.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten .....	52
3.5.2	Konzentrationsbestimmungen von Proteinen über BCA.....	52
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	52
3.5.4	Western Blot.....	53
<b>3.6</b>	<b>Tierversuche .....</b>	<b>53</b>
3.6.1	Versuchstiere .....	53
3.6.2	Methoden der MCMV Infektion .....	54
3.6.2.1	Herstellung Virusstock .....	54
3.6.2.2	Infektion mit MCMV .....	54
3.6.2.3	Präparation von Organen.....	55
3.6.2.4	Bestimmung der Viruslast in den Organen mittels Luciferase Assay .....	55
3.6.3	Methoden der <i>Toxoplasma</i> Infektion .....	55
3.6.3.1	Präparation von <i>T. gondii</i> -Zysten.....	55
3.6.3.2	Präparation von Milz, Leber und Lunge für die FACS-Analyse.....	56
<b>3.7</b>	<b>Durchflusszytometrie (FACS).....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung der Lokalisation von mGBP Proteinen in der Zelle... 59</b>	
4.1.1	Lipid Bodies.....	59
4.1.2	Interaktion mit dem Adapterprotein p62/SQSTM1.....	61
<b>4.2</b>	<b>Erkennung von <i>T. gondii</i> und Signaltransmission nach Infektion <i>in vitro</i>..... 62</b>	
4.2.1	Live cell imaging.....	62
4.2.2	mGBP2 Lokalisation in MyD88 defizienten MEFs .....	69
4.2.3	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die mGBP-Rekrutierung zur <i>T. gondii</i> PV .....	71
4.2.3.1	Zytoskelett-Abhängigkeit der Translokation von mGBP2 zur PV .....	71
4.2.3.2	Untersuchungen der Abhängigkeit der mGBP2-Translokation von ERK1/2, intrazellulärem Kalzium und der Proteinkinase C .....	72
4.2.4	Identifizierung eines für die Rekrutierung von mGBPs zur <i>T. gondii</i> PV wichtigen Sequenzmotivs .....	76
4.2.4.1	mGBP10/6 Hybrid-Protein .....	78
4.2.4.2	mGBP6/mGBP10 Mutationsanalyse .....	80
4.2.5	Inhibition der Sekretion von Rhoprien Proteinen mittels 4'-Bromophenacyl Bromid .....	91
4.2.6	Selektive Permeabilisierung der parasitophoren Vakuolenmembran zur Topologiebestimmung von mGBP2.....	95
4.2.7	Abhängigkeit der Translokation zur <i>T. gondii</i> PV von mGBP2 und p62/SQSTM1 .....	98
<b>4.3</b>	<b>mGBPs im Zusammenhang mit Autophagie..... 102</b>	
4.3.1	ATG5-Abhängigkeit der mGBP2 Kolokalisation .....	102
4.3.2	Basale LC3 Level in mGBP2 defizienten MEFs .....	106
<b>4.4</b>	<b>Die Rolle von mGBP2 im Infektionsmodell .....</b>	<b>109</b>

4.4.1	Cytomegalovirus Infektion und mGBP2-Defizienz .....	109
4.4.2	Infektion von mGBP2 <sup>-/-</sup> Tieren mit <i>T. gondii</i> .....	118
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>125</b>
<b>5.1</b>	<b>Lokalisation von mGBPs in der Zelle.....</b>	<b>125</b>
5.1.1	<i>Live cell imaging</i> der mGBP2 Rekrutierung an die <i>T. gondii</i> PV.....	125
5.1.2	Lokalisation von mGBP2 in der Zelle.....	127
5.1.3	Topologie von mGBP2 an der PV .....	129
<b>5.2</b>	<b>Bedingungen für die Rekrutierung von mGBPs zur PVM .....</b>	<b>130</b>
5.2.1	Die Rekrutierung von mGBP2 ist MyD88 unabhängig .....	131
5.2.2	Die mGBP2 Rekrutierung ist unabhängig von Mikrotubuli und Aktinfilamenten .....	132
5.2.3	Die mGBP Rekrutierung zur PVM von <i>T. gondii</i> ist MAPK, PKC und Ca <sup>2+</sup> unabhängig .....	135
<b>5.3</b>	<b>Die C-terminale Aminosäure D542 beeinflusst die Lokalisation von mGBP6 .....</b>	<b>138</b>
<b>5.4</b>	<b>Rhoprien Proteine von <i>T. gondii</i> beeinflussen die mGBP Rekrutierung.....</b>	<b>141</b>
<b>5.5</b>	<b>mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen zeigen eine veränderte autophagische Aktivität .....</b>	<b>143</b>
<b>5.6</b>	<b>mGBP2 besitzt einen antiviralen Effekt gegen MCMV .....</b>	<b>146</b>
<b>5.7</b>	<b>Einfluss von mGBP2 auf frühe zelluläre Immunantworten nach <i>T. gondii</i> Infektion</b>	<b>148</b>
<b>5.8</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>150</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>.....</b>	<b>153</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>.....</b>	<b>161</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>.....</b>	<b>163</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>.....</b>	<b>189</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der 65 kDa mGBPs, Mx-Proteine, Dynamine und ausgewählter IRGs, nach Degrandi et al 2007. ....	15
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> . Modifiziert nach (Hunter und Sibley, 2012).....	20
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Herpesvirions.....	28
Abbildung 4: Zeitliche Abfolge einer <i>T. gondii</i> Infektion. ....	31
Abbildung 5: Kolokalisationsstudien zwischen Lipid Bodies und mGBP1-positiven Vesikeln; .....	60
Abbildung 6: Kolokalisationstudie zwischen mGBP2 (grün) und p62 (rot) in GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	62
Abbildung 7: <i>Live cell Imaging</i> von IFN $\gamma$ -stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	63
Abbildung 8: <i>Live cell imaging</i> von IFN $\gamma$ stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	64
Abbildung 9: <i>Live cell imaging</i> von IFN $\gamma$ stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	65
Abbildung 10: <i>live cell imaging</i> von IFN $\gamma$ stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	65
Abbildung 11: <i>Live cell imaging</i> von IFN $\gamma$ -stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	66
Abbildung 12: <i>Live cell imaging</i> von IFN $\gamma$ stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs.....	67
Abbildung 13: <i>Live cell imaging</i> mit mCherry- (rot) exprimierenden, über Nacht mit IFN $\gamma$ stimulierten GFP-mGBP2-rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs (Video 02).....	68
Abbildung 14: <i>Live cell imaging</i> mit mCherry- (rot) exprimierenden, über Nacht mit IFN $\gamma$ stimulierten GFP-mGBP2-rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs (Video 02).....	68
Abbildung 15: <i>Live cell imaging</i> mit mCherry (rot) exprimierenden, über Nacht mit IFN $\gamma$ stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2 <sup>-/-</sup> MEFs (Video 03).....	69
Abbildung 16: Kolokalisation zwischen mGBP2 und <i>T. gondii</i> in MyD88 defizienten MEFs ..	70
Abbildung 17: Analyse der <i>in vitro</i> Anwendung von Mikrotubuli-Inhibitoren .....	72
Abbildung 18: <i>In vitro</i> Anwendung von ERK1/2 Inhibitor U0126. ....	74
Abbildung 19 mGBP2 Lokalisation nach Gö6976-Inkubation und <i>T. gondii</i> Infektion.....	75
Abbildung 20: Lokalisation von GFP-mGBP2 unter kalziumdepletierenden Bedingungen ....	76
Abbildung 21 Lokalisation von mGBP6 WT und mGBP10 WT .....	77
Abbildung 22: Schema der Herstellung des mGBP6/10-Hybrid-Proteins.....	78
Abbildung 23: Lokalisation des mGBP10.1-6.2 Hybrid-Proteins.. ..	79
Abbildung 24: ClustalW Alignment der Proteinsequenzen von mGBP6 und mGBP10.....	81
Abbildung 25: Mutationskonstrukte 1-5.....	83
Abbildung 26: Mutationskonstrukte 6 und 7.....	84
Abbildung 27: Mutationskonstrukte 8 und 9.....	85

Abbildung 28: Transiente Transfektion von mGBP10-N542D-Mutationskonstrukten .....	87
Abbildung 29: Transiente Transfektion von mGBP2-E548N Mutationskonstrukten .....	88
Abbildung 30: mCherry-mGBP6 stabil exprimierende MEFs .....	89
Abbildung 31: mCherry-mGBP6 stabil exprimierende MEFs .....	90
Abbildung 32: Einfluss von 4-BPB auf die mGBP2 Rekrutierung nach <i>T. gondii</i> ME49- Infektion .....	92
Abbildung 33: Einfluss des Inhibitors 4-BPB auf die Relokalisation von mGBP2 nach BK- <i>T. gondii</i> Infektion.....	94
Abbildung 34: Selektive Permeabilisierung von murinen embryonalen Fibroblasten .....	96
Abbildung 35: Selektive Permeabilisierung nach Infektion mit <i>T. gondii</i> Stamm BK; .....	97
Abbildung 36: Kinetik der Kolokalisation von GFP-mGBP2 (grün) und p62 (rot).....	99
Abbildung 37: Western Blot p62/SQSTM1 knock down in GFP-mGBP2-exprimierenden MEFs. ....	100
Abbildung 38: p62 „knock down“ in GFP-mGBP2-exprimierenden MEFs.....	101
Abbildung 39: p62-Lokalisation in mGBP2 defizienten MEFs .....	102
Abbildung 40: mGBP2-Lokalisation in ATG5 <sup>-/-</sup> und ATG5 <sup>+/+</sup> MEFs.....	103
Abbildung 41: Einfluss verschiedener Autophagie-Inhibitoren auf die GFP-mGBP2- Kolokalisation mit <i>T. gondii</i> in wildtypischen MEFs.....	105
Abbildung 42: Western Blot-Analyse von LC3 und p62 in primären WT und mGBP2- defizienten MEFs .....	107
Abbildung 43: Darstellung der relativen LC3-II Bandenintensitäten in Korrelation zu der β-Aktin-Ladkontrolle. ....	108
Abbildung 44: Viruslast nach MCMV Infektion in der Milz von WT (schwarz) und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot) .....	110
Abbildung 45: Viruslast nach MCMV Infektion in der Speicheldrüse von WT (schwarz) und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot).....	110
Abbildung 46: Viruslast nach MCMV Infektion in der Leber von WT (schwarz) und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot) .....	110
Abbildung 47: Viruslast nach MCMV Infektion in der Lunge von WT (schwarz) und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot) .....	111
Abbildung 48: Viruslast nach MCMV Infektion in der Milz von WT (schwarz) und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot) .....	111
Abbildung 49: Viruslast nach MCMV Infektion in der Speicheldrüse von WT (schwarz) und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot).....	112
Abbildung 50: Viruslast nach MCMV Infektion in der Leber von WT (schwarz) und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot) .....	112
Abbildung 51: Viruslast nach MCMV Infektion in der Lunge von WT (schwarz) und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen (rot).. ..	113
Abbildung 52: Western Blot. Expression von mGPB1, 2, 3 und 5 in Milz und Speicheldrüsen von MCMV infizierten WT oder mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	113
Abbildung 53: Western Blot. Expression von mGPB1, 2, 3 und 5 in Leber und Lunge von MCMV infizierten WT oder mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	114

---

Abbildung 54: Real-Time PCR-Ergebnisse für Milz und Speicheldrüsen aus zwei MCMV-Infektionsversuchen .....	116
Abbildung 55: Real-Time PCR-Ergebnisse für Leber und Lunge aus zwei MCMV-Infektionsversuchen .....	117
Abbildung 56: FACS-Analyse von Milz und Lymphknoten in WT und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen ....	118
Abbildung 57: Dot-Plots der FACS-Analyse von Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	120
Abbildung 58: Zellpopulationen in Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	120
Abbildung 59: Zellpopulationen in Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	121
Abbildung 60: Dot-Plots der FACS-Analyse von Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	122
Abbildung 61: Zellpopulationen in Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	122
Abbildung 62: Modell der GBP Tetramerbildung nach Syguda et al. (2012) .....	139
Abbildung 63: Strukturmodell von mGBP6 .....	140
Abbildung 64: Ausschnitt des ClustalW Alignment ausgewählter mGBPs .....	141

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anwendung verschiedener Inhibitoren <i>in vitro</i> .....	47
Tabelle 2: Überblick der Mutationen im dsRed-mGBP6-Konstrukt. ....	81
Tabelle 3 Überblick der Mutationsanalyse von dsRed-mGBP6-Konstrukten .....	86
Tabelle 4: Auswertung der Kolo-kalisation von mCherry-mGBP6 Konstrukten .....	91
Tabelle 5 Einfluss des Inhibitors 4-BPB auf die Kolo-kalisation von mGBP2 nach ME49- und BK- <i>T. gondii</i> Infektion von MEFs. ....	93
Tabelle 6 Auswertung selektive Permeabilisierung; .....	98

## Abkürzungen

4-BPB	4-Bromophenacyl Bromide	kDa	kilo Dalton
APC	Antigen-präsentierende Zelle	LC3	<i>microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A</i>
ATG	<i>autophagy-related gene</i>	LPS	Lipopolysaccharid
BCA	Bicinchoninsäure	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium	MEF	murine embryonale Fibroblasten
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
CMV	Cytomegalovirus	NADP/NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	NK	natürliche Killerzellen
DMSO	Dimethylsulfoxid	NO	Stickstoffmonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	p.i.	<i>post Infection</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PFA	Paraformaldehyd
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PFU	<i>plaque forming units</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>	PKC	Proteinkinase-C
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	PV	Parasitophore Vakuole
FCS	<i>fetal calf serum</i>	PVM	Parasitophore Vakuolen Membran
GAS	<i>Interferon-Gamma Activated Sequence</i>	RLU	<i>relative luciferase units</i>
GBP	Guanylat Bindendes Protein	ROP	Rhoprien Proteine
GDP	Guanosindiphosphat	ROS	Reaktive Sauerstoffintermediate, reactive oxygen species
GFP	grün fluoreszierendes Protein	rpm	Umdrehung pro Minute, <i>revolutions per minute</i>
GMP	Guanosinmonophosphat	RT	Raumtemperatur
GTP	Guanosintriphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
H <sub>2</sub> O	Wasser	SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , Mangelmedium	SQSTM1	<i>Sequestosom-1</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
HFF	humane Vorhaut Fibroblasten	TAE	Tris-Acetat-EDTA
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase	TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
IFN	Interferon	Tirap	<i>toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein</i>
IFNGR	Interferon gamma Rezeptor	TLR	Toll-like Rezeptor
IL	Interleukin	Tram	<i>translocating chain-associated membrane protein</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>	Trif	<i>toll-like receptor adaptor molecule 1</i>
IRG	<i>Immune related GTPase</i>	UV	Ultraviolett
JAK	Janus Kinase	WB	Western Blot
kb	kilo Basenpaare	WT	Wildtyp



## Zusammenfassung

Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ist eines der wichtigsten Zytokine, für die Vermittlung der Resistenz gegen intrazelluläre Parasiten vermitteln. Nach IFN $\gamma$  Stimulation werden in der Zelle verschiedene GTPasen hochreguliert, inklusive der p65 Guanylate-bindenden Proteine (GBPs). In den vergangenen Jahren konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass verschiedene mGBPs nach IFN $\gamma$  Stimulation und *Toxoplasma gondii* Infektion eine Lokalisationsänderung in der Zelle aufweisen. Sie rekrutieren von ihrer ursprünglichen Vesikel-ähnlichen Verteilung im Zytoplasma um die parasitophore Vakuole (PV) des Parasiten herum. Dies implizierte eine anti-parasitäre Funktion für die mGBPs in der Zelle, die in Infektionsversuchen mit der bereits generierten mGBP2<sup>-/-</sup> Maus bestätigt werden konnte. Die mGBP2-defiziente Mauslinie zeigt eine erhöhte Suszeptibilität, charakterisiert durch eine erhöhte Anzahl von *T. gondii* Gewebezysten im Gehirn und erhöhter Mortalität im Verlauf der Infektion.

Ziel dieser Arbeit war es, zelluläre Mechanismen genauer zu charakterisieren, die zu der Akkumulation der mGBPs um die parasitophore Vakuole (PV) herum führen. Des Weiteren sollten Proteindomänen beschrieben werden, die für die Akkumulation an der PV wichtig sind. Die mGBP2<sup>-/-</sup> Maus sollte im parasitären (*T. gondii*) und viralem (MCMV) Infektionsmodell genauer charakterisiert werden.

Es zeigte sich, dass die Akkumulation von mGBP2 an die PV unabhängig vom *Toll-like* Rezeptor (TLR) Adapterprotein MyD88 ist, sodass die mGBP Rekrutierung wahrscheinlich TLR unabhängig erfolgt. Auch eine Abhängigkeit der Rekrutierung von MAP-Kinase (Mitogen aktivierte Protein Kinase) konnte nicht gezeigt werden. Obwohl die Infektion mit *T. gondii* Veränderungen im intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Level auslöst, konnte keine Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der mGBP Rekrutierung gezeigt werden.

Eine wichtige Effektor-Funktion von mGBP2 im Prozess des PV Abbaus zeigte sich in Immunfluoreszenz-Versuchen mit Hilfe einer selektiven Permeabilisierung. Es konnte beobachtet werden, dass es bei mGBP2 positiven PVs zu einer Durchlässigkeit der PV-Membran für einen *T. gondii* spezifischen Antikörper kommt, die nicht durch den Einsatz des Detergenz erklärt werden kann. Vergleichbares konnte bei mGBP2 negativen PVs nicht beobachtet werden und ebenfalls nicht nach Infektion mit virulenten BK Toxoplasmen, die eine Rekrutierung von mGBPs um ihre PV verhindern können.

*Live cell imaging* Aufnahmen zeigten, dass mGBP2 Vesikel einen hohen Grad an Dynamik aufweisen. Schon vor Infektion zeigen sich verschiedene dynamische Prozesse, wie Verschmelzungen und Abspaltungen von Vesikeln untereinander. Nach Infektion mit *T. gondii* konnte die schnelle Akkumulierung von mGBP2 um die PV beobachtet werden. Es zeigte sich, dass weniger ganze Vesikel zielgerichtet an die PV rekrutieren, sondern es sich um verschiedenste dynamische Prozesse handelte. Zum einem verschmolzen Vesikel mit der PV, lösten sich aber auch wieder ab. Viele Vesikel in PV Nähe wurden kleiner, sodass es wahrscheinlich ist, dass mGBP2 aus den Vesikeln entlassen wird und in freier Form an die PV rekrutiert.

Diese Beobachtungen stimmen auch mit Ergebnissen verschiedener Zytoskelett-Inhibitionen überein. Auch nach Einsatz verschiedener Inhibitoren kam es zu einer Akkumulation von mGBP2 an die PV. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Akkumulation von mGPBS um die PV unabhängig vom Zytoskelett erfolgt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Bewegungen der mGBP2 Vesikel innerhalb der Zelle Zytoskelett abhängig sind und nur die Dissoziation von mGBP2 Molekülen aus den Vesikeln zu der PV Zytoskelett unabhängig erfolgt.

Es zeigte sich, dass die Akkumulation von mGBP2 an die PV von ATG5 abhängt. In ATG5<sup>-/-</sup> Zellen kam es zu einer verringerten Akkumulation von mGBP2 an der PV. ATG5 ist bedeutend für die Membranelongation während der Autophagie und könnte somit auch für die Rekrutierung maßgeblicher Effektor-Moleküle (wie den mGBPs) während einer Infektion, im Rahmen der Autophagie als Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Parasiten, wichtig sein. Wir vermuten einen ATG5-abhängigen, aber Autophagie-unabhängigen Mechanismus, der für den Transport wichtiger Effektorproteine wie die mGBPs an die PV von *T. gondii* verantwortlich ist.

Für die Aufklärung wichtiger Motive bzw. Aminosäuren in der mGBP Sequenz, die zu der Rekrutierung an die *T. gondii* PV führen, wurde ein Hybridprotein zwischen mGBP6 und mGBP10 hergestellt. Diese Mitglieder der mGBP-Familie sind besonders interessant, denn sie unterscheiden sich nur in 14 Aminosäuren. Während mGBP6 an die PV von *T. gondii* rekrutiert kann mGBP10 dies nicht. Mit Hilfe des Hybridproteins und Mutagenese Versuchen konnte eine für die Rekrutierung wichtige Aminosäure im C-Terminalen Proteinteil identifiziert werden (D542N).

Des Weiteren zeigte sich, dass die Rekrutierung der mGBPs nach Infektion mit virulenten *T. gondii* Stämmen, wie Typ I BK-Toxoplasmen, durch Rhoptrien Proteine (ROP) verhindert wird. Nach Inhibition der ROP Sezernierung, konnte eine steigende Anzahl von mGBP2 positiven PVs um virulente BK *Toxoplasmen* herum detektiert werden.

Eine neue Funktion von mGBP2 in der Abwehr von viralen Infektionen konnte durch Infektionsversuche von mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen mit mCMV beschrieben werden. Hier zeigten die mGBP2<sup>-/-</sup> eine erhöhte Viruslast in den Organen nach Infektion im Vergleich zu WT Tieren.

## Summary

Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) is a major cytokine that mediates resistance against intracellular parasites. After IFN $\gamma$  stimulation several GTPases are upregulated in cells, including the p65 guanylate-binding proteins (GBPs). In recent years our group could show, that several mGBPs relocate after *Toxoplasma gondii* infection from their former vesicular-like structure to the parasitophorous vacuole (PV) of the parasite, indicating an anti-parasitic role for the mGBPs within the cell. This was demonstrated in infection experiments in the mGBP2<sup>-/-</sup> mice; which showed an increased susceptibility against *T. gondii* infection, characterized by a higher amount of *T. gondii* containing cysts in the brain and an increased lethality.

The aim of this work was to characterize the cellular mechanisms, which lead to the accumulation of the mGBPs at the *T. gondii* PV membrane. Additionally the identification of protein motifs, which are important for the intracellular re-localization of the mGBPs after *T. gondii* infection, was of interest. Finally, the mGBP2<sup>-/-</sup> mice were characterized in a parasitic (*T. gondii*) as well as in a viral (MCMV) model.

The accumulation of the mGBP2 at the parasitophorous vacuole (PV) of *T. gondii* was independent from the toll-like receptor (TLR) adaptor protein MyD88; this implicates a TLR-independent recruitment of the mGBPs to the PV. Also the host MAPK (mitogen activated protein kinase) and intracellular Ca<sup>2+</sup>-levels appear to have no effect on the mGBP recruitment.

An important effector function for mGBP2 was seen in immune fluorescence staining experiments after selective permeabilization of infected cells. Only mGBP2-positive PVs were permeable for the *T. gondii* specific antibody. This was not seen in mGBP2-negative PVs or after infection with the virulent *T. gondii* strain BK, which is able to prevent mGBP recruitment at the PV.

Live cell imaging videos showed that the mGBP2 vesicles are highly dynamic within the cell. Several fusion and fission processes could be observed, before and after *T. gondii* infection. The rapid accumulation of mGBP2 early after parasite entry could be observed, however a direct correlation with vesicle movement could not be established. mGBP2 appears to be released from the vesicles, followed by diffusion and accumulation around the PV. This notion was supported by experiments, in which the cytoskeleton dynamic was blocked by several inhibitors. After inhibition of the cytoskeleton dynamics, mGBP2 recruitment to the *T. gondii* PV was still detectable.

First results indicate a role of the autophagy related protein ATG5. In ATG5-deficient fibroblasts less accumulation of mGBP2 around the *T. gondii* PV could be observed. However, inhibition of autophagy by several chemical inhibitors had no effect on mGBP2 recruitment.

We suggest an Atg5-dependent but autophagy independent mechanism for the delivery of proteins with important effector functions like the mGBPs to the *T. gondii* PV.

To identify protein motifs and amino acids, which are crucial for mGBP recruitment to the PV, a hybrid protein of mGBP6 and mGBP10 was cloned. These are highly interesting representatives of the mGBP family, because both proteins show very high sequence identity but differ in their recruitment capacity. With mutational analyses a single amino acid in the C-terminal part of the protein to be important for the recruitment to the PV could be determined (D542N).

Furthermore, it could be shown that the recruitment of the mGBPs was dependent on *T. gondii* rhoptry proteins (ROP), since the ROP proteins of the virulent BK *T. gondii* strain prevent the accumulation of mGBPs. This was demonstrated by using a ROP-secretion-inhibitor, where mGBP accumulation detectable around the PV of virulent BK *T. gondii*.

A new function of mGBP2 in the defense of viral infection could be described. After mCMV infection of mGBP2<sup>-/-</sup> mice a higher viral load was detected in several organs as compared to WT mice.

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem

Das Immunsystem ist ein interaktives Netzwerk von Organen, Zellen, löslichen Faktoren und Botenstoffen (Zytokinen). Es schützt einen Organismus vor der permanenten Gefahr einer Infektion mit pathogenen Organismen, wie Pilzen, Bakterien, Viren oder Parasiten oder auch vor entarteten, körpereigenen Zellen. Die essentielle Funktion des Immunsystems wird besonders deutlich, wenn es in seiner Funktion gestört ist. Eine verringerte oder fehlende Aktivität resultiert in ernsthaften Infektionen oder Tumoren. Eine zu hohe Aktivität führt zu allergischen Reaktionen auf harmlose Antigene oder zu Autoimmunerkrankungen, bei denen körpereigene Komponenten vom eigenen Immunsystem angegriffen werden (Janeway CA, 2001).

Das Immunsystem wird in zwei Bereiche unterteilt, definiert durch die Schnelligkeit und Spezifität der Reaktion. Dabei unterscheidet man das angeborene Immunsystem (*innate immunity*), geprägt durch eine sehr schnelle Reaktion auf körperfremde oder entartete Strukturen, und dem erworbenen Immunsystem (*adaptive immunity*), welches durch hohe Spezifität der Reaktionen charakterisiert ist. Phylogenetisch ist das angeborene Immunsystem hoch konserviert, und schon in einfachsten Lebewesen zu finden, wobei das angeborene Immunsystem ein Kennzeichen höherer Lebewesen ist (Janeway CA, 2001).

Obwohl die beiden Systeme häufig getrennt voneinander betrachtet werden, existiert ein hoher Grad an Interaktionen zwischen beiden. Eine große Aufgabe des Immunsystems ist, zu erkennen, ob eine Zelle durch Mikroben infiziert wurde und nun womöglich zur Vermehrung der Mikroben genutzt wird. Bei der Unterscheidung von normalen, körpereigenen Zellen und von infizierten Zellen haben die MHC-Moleküle eine wichtige Funktion. MHC steht für Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*) (Doherty und Zinkernagel, 1975). Dies sind Zelloberflächen-Glykoproteine, die Peptidfragmente im Inneren der Zelle binden und an der Zelloberfläche präsentieren. Dabei unterscheidet man MHC-I Komplexe, die Peptide präsentieren, die innerhalb der Zelle synthetisiert werden. Dies sind zum Beispiel körperfremde Peptide nach einer Virusinfektion. MHC-II Komplexe präsentieren Peptide aus phagozytierten Strukturen an der Zelloberfläche. Um Zellen innerhalb des Immunsystems zu charakterisieren, werden bestimmte Oberflächenmarker genutzt, die im sogenannten CD-System (*cluster of differentiation*) eingeteilt werden (Bernard und Boumsell, 1984; Fiebig et al., 1984). Die physiologische Bedeutung der Oberflächenmarker ist weit gefächert, sie können als Rezeptoren, Liganden oder für die Adhäsion von Zellen wichtig sein. Die Kombination verschiedener CD-Moleküle erlaubt eine spezifische Phänotypisierung von Immunzellen, wie zum Beispiel CD3 als T-Lymphozyten-Marker, die wiederum weiter unterteilt werden können in CD3+CD4+ T-Helferzellen oder CD3+CD8+ zytotoxische T-Zellen (Janeway CA, 2001).

### 1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem (*innate immune system*) ist die erste Barriere in der Abwehr von pathogenen Mikroben. Häufig werden auch physikalische Grenzen, wie Epithelien und die Haut im Zusammenhang mit den Kompartimenten des angeborenen Immunsystems aufgelistet. Aber gebräuchlich umfasst das angeborene Immunsystem Zellen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen sowie Bestandteile des Komplementsystems, Akute-Phase-Proteine und Zytokine (Janeway CA, 2001). Die Mechanismen des angeborenen Immunsystems sind genetisch festgelegt, sie erkennen molekulare Muster, die von vielen Mikroben geteilt werden, aber in der Art nicht im Wirt selber vorkommen. Die Erkennungs-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind weit verbreitet auf vielen Zellen im Wirt exprimiert, daher können Reaktionen auf eingedrungene Mikroben sehr schnell ausgelöst werden (Janeway CA, 2001).

Die wichtigsten Funktionen des angeborenen Immunsystems können in fünf Aufgaben unterteilt werden. In erster Linie dient es als physikalische und chemische Barriere, um das Eindringen infektiöser Reizstoffe zu verhindern. Außerdem führt es zur Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Infektion mittels chemischer Faktoren, die während der induzierten Entzündungsprozesse freigesetzt werden, wie Zytokine. Des Weiteren wird das Komplement System aktiviert, um Pathogene zu zerstören und um weitere Immunzellen chemotaktisch zum Ort der Infektion zu führen (Janeway CA, 2001). Fremde molekulare Muster werden erkannt und daraufhin phagozytierende Zellen aktiviert, um fremde Substanzen aus Organen, Geweben, Blut oder Lymphsystem zu entfernen. Durch die Präsentation von Antigenen wird innerhalb des angeborenen Systems die Aktivierung des adaptiven Immunsystems gewährleistet (Janeway CA, 2001).

Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems, um fremdartige Substanzen zu erkennen, sind die *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs). Diese werden besonders in Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, aber auch in Granulozyten (Neutrophile, Basophile), Eosinophile, Epithelzellen und Keratinozyten. Die meisten Säugetiere haben zwischen 10 und 15 verschiedene TLRs. Im Menschen wurden 10 und in der Maus wurden 12 TLRs identifiziert (Chuang und Ulevitch, 2000; Du et al., 2000; Kawai und Akira, 2010). Die verschiedenen TLRs erkennen spezifisch unterschiedliche pathogenassoziierte Strukturen, wie RNA, DNA, Proteine oder andere Oberflächenstrukturen wie Lipide. Der am besten beschriebene Signalweg ist die Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien durch TLR4 (Poltorak et al., 1998). Die Rezeptoren sind entweder an der Zelloberfläche zu finden oder im Endosom, je nachdem welche Strukturen sie erkennen. Die endosomalen TLRs erkennen Nukleinsäuren, die zum Beispiel durch eine Virusinfektion in die Zelle gelangen. Nach TLR-Aktivierung erfolgt die Rekrutierung bestimmter Adaptermoleküle, wie MyD88, Tirap, Trif und Tram (Fekonja et al., 2012; Shigeoka et al., 2007; Song und Lee, 2012; Yamamoto et al., 2003; Yamamoto et al., 2002).

Die durch TLR-Aktivierung ausgelöste Signalkaskade läuft über Adaptermoleküle. Insgesamt wurden bisher vier Adaptermoleküle beschrieben: MyD88, Tirap, Trif und Tram (Kawai und Akira, 2010; Shiloh et al., 1999; Yamamoto et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Es wird zwischen MyD88-abhängigen und Trif-abhängigen Signalkaskaden unterschieden. Bis auf TLR3 wird bei allen TLRs das Signal abhängig von MyD88 weitergeleitet. Bei TLR3 läuft die Signalweiterleitung abhängig von Trif, TLR4 kann alle vier Adaptermoleküle rekrutieren und für die Signalweiterleitung nutzen (Kawai und Akira, 2010). Unabhängig von unterschiedlichen Adaptermolekülen endet die TLR-Signalkaskade mit der Aktivierung von NF $\kappa$ B und MAP-Kinasen (*mitogen activated kinases*). Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert die Transkription von inflammatorischen Zytokinen (Kawai und Akira, 2007). Abhängig von Liganden können unterschiedliche Mechanismen nach TLR-Aktivierung induziert werden. In Reaktion auf mikrobielle Erkennungsmuster werden inflammatorische Zytokine produziert (Kawai und Akira, 2010). Virulenzfaktoren von Pathogenen können dazu führen, dass pathogene Organismen phagozytiert werden und mit Hilfe ihrer präsentierten Antigene CD4+ Zellen aktiviert werden (Castellino und Germain, 2006). Wird eine virale Infektion erkannt, können die infizierten Zellen die Proteinsynthese unterbrechen. Es kann auch ein programmierter Zelltod (Apoptose) aktiviert werden und Immunzellen können antivirale Faktoren wie Interferone produzieren (Janeway CA, 2001).

Die durch die TLRs induzierten inflammatorischen Zytokine gehören zu den ersten und wichtigsten Aktivatoren des angeborenen Immunsystems (Janeway CA, 2001). Die durch die Zytokine ausgelösten Entzündungsprozesse schaffen eine Barriere, die ein Ausbreiten der Infektion verhindern soll (Stvrtinova, 1995). Unter anderem werden auch phagozytierende Zellen zum Ort der Infektion rekrutiert, wie Granulozyten (Stvrtinova, 1995). Die neutrophilen Granulozyten setzen Faktoren frei, die andere Immunzellen aktivieren.

Das Komplement System besteht aus mehr als 25 Plasma- und Zelloberflächenproteinen, diese werden in einer sich verstärkenden Signalkaskade aktiviert. Das bedeutet, dass ein einziges aktiviertes Molekül dazu führt, dass tausende Effektormoleküle generiert werden. Es können drei verschiedene Signalwege aktiviert werden, durch deren Intermediate der Schutz vor Neuinfektionen gewährleistet wird oder pathogene Zellen lysiert werden (Janeway CA, 2001).

Zu den wichtigsten Zellen innerhalb des angeborenen Immunsystems gehören die Leukozyten. Sie entwickeln sich aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (Alberts B, 2002). Zu ihnen gehören phagozytierende Zellen, wie Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen. Außerdem NK-Zellen (*natural killer cells*), Mastzellen, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten (Janeway CA, 2001)

Die phagozytisch aktiven Zellen internalisieren pathogene Mikroben und zerstören diese mit Hilfe von verschiedenen Effektormolekülen, wie Stickstoffmonoxid, reaktive Sauerstoffintermediate (ROS, reactive oxygen species) und abbauende Enzyme. Um die

Aufnahme und somit die Bekämpfung von Mikroben zu erhöhen, besitzen die phagozytierenden Zellen ein breites Spektrum von Fc- und Komplement-Rezeptoren.

Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten und können sich zu gewebe- bzw. organ-spezifischen Makrophagen differenzieren. Besonders ist ihre Fähigkeit das vaskuläre System zu verlassen und fremde Substanzen und Mikroorganismen besonders effektiv zu phagozytieren (Janeway CA, 2001). Infolgedessen werden Chemokine produziert, um weitere Immunzellen zum Ort der Infektion zu rekrutieren (Janeway CA, 2001). Dendritische Zellen sind ebenfalls phagozytierende Zellen, die besonders präsent in Geweben sind, die im direkten Kontakt mit der Umwelt stehen, wie der Haut oder den Schleimhäuten (Alberts B, 2002). Sie sind besonders wichtig in ihrer Funktion phagozytierte Substanzen innerhalb der Zelle zu prozessieren und so entstandene Peptide als Antigene zu präsentieren. Daher funktionieren sie als Link zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem, das durch präsentierte Antigene aktiviert wird. Den größten Anteil an phagozytierenden Zellen bilden mit 50 - 60% die neutrophilen Granulozyten (Stvrtinova, 1995). Sie werden wie die eosinophilen und basophilen Granulozyten charakterisiert durch zahlreiche intrazelluläre Granula. Diese enthalten verschiedene toxische Substanzen, die pathogene Bakterien und Pilze inhibieren oder abtöten können. Dazu zählen oxidative Intermediate wie Wasserstoffperoxid oder freie Sauerstoffradikale (Kariyawasam und Robinson, 2006).

Die NK-Zellen (*natural killer cells*) entwickeln sich IL-12- und IL-15-abhängig im Knochenmark. Sie zeigen eine zytotoxische Aktivität gegen Zellen, in denen die Expression von Oberflächenmolekülen der MHC-I Klasse reduziert ist. Dies ist ein wichtiger Mechanismus, weil viele Viren die verringerte MHC-I-Expression fördern, um der Erkennung durch CD8+ T-Zellen zu entgehen (Brodin et al., 2010; Ljunggren und Karre, 1990).

Mastzellen findet man vorwiegend im Bindegewebe und in Schleimhäuten. Neben der Bekämpfung von Pathogenen und der Wundheilung spielen sie auch während allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle (Stvrtinova, 1995). Durch Aktivierung werden von Mastzellen verschiedene Faktoren freigesetzt, u.a. Histamine, Chemokine und Zytokine. Durch die Histamin Freisetzung werden neutrophile Granulozyten und Makrophagen rekrutiert und Entzündungsprozesse eingeleitet (Stvrtinova, 1995). Auch basophile Granulozyten setzen nach Aktivierung Histamine frei, sowie verschiedene hoch-toxische Proteine und freie Radikale, die Bakterien und Parasiten bekämpfen.

### **1.1.2 Adaptives Immunsystem**

Die Reaktionen des erworbenen, oder auch adaptiven, Immunsystems sind antigenspezifisch und werden durch T- und B-Lymphozyten vermittelt (Janeway CA, 2001). Die Spezifität wird durch die Neuordnung von genetischen Elementen erreicht, die für antigenbindende Strukturen kodieren: ein Prozess, der als somatische Rekombination bezeichnet wird. Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem, welches sehr schnell reagieren kann, werden Mechanismen des erworbenen Immunsystems verzögert aktiviert. Die bestehenden spezifischen Zellpopulationen sind sehr gering, eine

Proliferation erfolgt erst, nachdem sie mit ihrem spezifischen pathogenen Erkennungsmotiv konfrontiert wurden (Janeway CA, 2001). Erst ab einer bestimmten Menge von Zellen kann eine effiziente Bekämpfung von Pathogenen erfolgen, somit kann es mehrere Tage dauern, um die spezifische Antwort zu entwickeln. Zu den wichtigsten Funktionen des adaptiven Systems gehören die Erkennung von „Selbst-“ und „Fremd-“Antigenen während der Antigenpräsentation, die Abtötung von infizierten Zellen, die Bildung von Antikörpern und die Ausbildung des immunologischen Gedächtnis (Gedächtniszellen) (Janeway CA, 2001). Die für die adaptive Antwort wichtigen B- und T- Zellen entwickeln sich aus den gleichen multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark (Janeway CA, 2001).

T-Zellen werden charakterisiert durch ihren spezifischen T-Zell Rezeptor (TCR). Dieser erkennt an MHC-Komplexe gebundene Peptidfragmente auf körpereigenen Zellen. Es können verschiedene Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen charakterisiert werden. CD4+ T-Helfer Zellen (TH) erkennen Peptide, die an MHC-II Komplexen gebunden sind und von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden. Sie regulieren die zelluläre und humorale Immunantwort, indem sie die Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Zellen (Plasmazellen) oder in Gedächtniszellen fördern (Chappell und Jacob, 2007; Goodnow et al., 2010). Außerdem aktivieren sie zytotoxische CD8+ T-Zellen und Makrophagen (Williams et al., 1991). CD8+ zytotoxische T-Zellen erkennen Antigene, die mittels MHC-I Komplexen auf allen kernhaltigen Zellen präsentiert werden. Die Erkennung der MHC-Komplexe reicht für die Aktivierung nicht aus, zusätzlich sind ko-stimulatorische Signale von antigenpräsentierenden Zellen wichtig (Sugamura et al., 2004). Innerhalb der T-Helferzellen entwickeln sich verschiedene Subtypen wie TH1, TH2 oder TH17. Diese Subtypen werden durch die Sekretion unterschiedlicher Zytokine und der damit verbundenen Aktivierung verschiedener Immunantworten charakterisiert. Weitere T-Zell-Subtypen können in regulatorische T-Zellen, die wichtig für die Immuntoleranz und die Regulation der T-Zell vermittelten Immunantwort sind, NKT-Zellen (*natural killer T-cells*) oder Gedächtnis-T-Zellen (*Memory T-cells*) unterschieden werden (Janeway CA, 2001). Zu den Funktionen der B-Zellen zählen die Produktion von Antikörpern, die Präsentation von Antigenen und die Entwicklung zu Plasma- und Gedächtniszellen (Chappell und Jacob, 2007; Goodnow et al., 2010). Charakterisiert werden sie durch den oberflächengebundenen B-Zell-Rezeptor, der ähnlich wie der T-Zell-Rezeptor zur Variabilität und Spezifität der B-Zellen beiträgt (Hombach et al., 1990; Reth, 1992). Die Reifung der B-Zellen erfolgt, wenn der B-Zell-Rezeptor ein passendes Antigen bindet. Es folgt die Differenzierung der Zellen in Plasmazellen, die antikörperproduzierenden Zellen. Die produzierten Antikörper zeigen die gleiche Spezifität wie die Rezeptoren und sind im Prinzip die lösliche Form der gebundenen Rezeptoren (Janeway CA, 2001). Sie bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Peptidketten. Die aminoterminalen Enden dieser Ketten bilden den variablen Teil der Antikörper und sind für die Spezifität verantwortlich. Der C-terminale Teil der Antikörper ist konstant und wird als Fc-Domäne bezeichnet und ist für die Effektorfunktionen der Antikörper verantwortlich. Denn er wird

durch Fc-Rezeptoren auf B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten erkannt und aktiviert die Effektorfunktionen der verschiedenen Immunzellen. Nach einer Infektion können sich B-Gedächtniszellen entwickeln, die im Falle einer erneuten Infektion mit bekannten Antigenen schnell proliferieren und spezifische Antikörper sezernieren können (Janeway CA, 2001).

## 1.2 IFN $\gamma$

Interferon wurde in der Mitte des 20. Jahrhunderts von Isaacs und Lindenmann (Isaacs und Lindenmann, 1957) als natürlich produzierte, antivirale Substanz in infizierten, bebrüteten Hühnereiern entdeckt. Interferone sind eine wichtige Klasse von Glykoproteinen innerhalb der Zytokine. Zytokine sind kleine Signalmoleküle in Form von Proteinen, Peptiden oder Glykoproteinen, die wichtige Regulatoren in diversen Signalübertragungsprozessen sind (Gilman A, 2001). Sie werden als Antwort auf verschiedene Pathogene wie Viren, Bakterien, Parasiten, aber auch als Reaktion auf Tumorzellen von Wirtszellen produziert. Durch Interferone kommunizieren Zellen miteinander und verschiedene Signalwege werden innerhalb des Immunsystems reguliert (Janeway CA, 2001).

In Säugetieren wurden bisher zehn verschiedene Interferone beschrieben, sieben davon im Menschen (Pestka, 2007). Sie werden anhand ihrer Rezeptorspezifität in verschiedene Klassen eingeteilt. Seit ihrer ersten Entdeckung wurden drei verschiedene Typen beschrieben (Chelbi-Alix und Wietzerbin, 2007). Es wird unterschieden zwischen Typ I (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\omega$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ ), Typ II (IFN $\gamma$ ) und Typ III (IFN $\lambda$ ) Interferonen (Pestka, 2007). Typ I Interferone binden an den IFN- $\alpha$  Rezeptor (IFNAR), dieser besteht aus zwei Untereinheiten, der IFNAR1 und IFNAR2 Kette. Den Typ I Interferonen wird besonders in der antiviralen Immunabwehr eine zentrale Rolle zugeschrieben (Garcia-Sastre et al., 1998; Van Hove et al., 2009). Als Hauptproduzenten gelten hämatopoetische Zellen und Fibroblasten (Schroder et al., 2004). Die erst kürzlich definierte Gruppe der Typ III Interferone ähneln den Typ I Interferonen, werden von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) als Reaktion auf virale Strukturen produziert und zeigen eine antivirale Wirkung (Kotenko et al., 2003; Mordstein et al., 2008). Sie binden an einen heterodimeren Rezeptor (IFN- $\lambda$ R), bestehend aus den Ketten CRF2-12 (auch IFN- $\lambda$ R1) und CRF2-4 (auch IL-10R2) (Bartlett et al., 2005). Wie der Typ I IFN Rezeptor, ist beim Typ III IFNR eine Phosphorylierung an einem spezifischen Tyrosinrest innerhalb der zytoplasmatischen Domäne notwendig, um das Signal intrazellulär weiterzuleiten (Dumoutier et al., 2004)

Ähnlich den Typ I Interferonen unterscheidet sich Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) strukturell sowohl auf genetischer Ebene als auch bezüglich der Proteinstruktur und bindet an einen eigenen Rezeptor, daher zählt es gesondert als Typ II Interferon (Pestka, 2007). Der IFN $\gamma$  Rezeptor (IFNGR), wird aus den zwei Untereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 gebildet. Obwohl IFN $\gamma$  der einzige Vertreter der Typ II Interferone ist, ist es von zentraler Bedeutung in der Immunantwort. Experimente haben ergeben, dass die transkriptionelle

Aktivität mehrerer hundert Gene in Folge eines IFN $\gamma$  Stimulus reguliert wird (Boehm et al., 1997; Der et al., 1998). IFN $\gamma$  trägt dazu bei, dass die erworbene Immunantwort (*adaptive immune response*) aufgebaut wird (Bot et al., 1998). Zu den IFN $\gamma$  Produzenten gehören CD4<sup>+</sup> Th1 Lymphozyten, CD8<sup>+</sup> zytotoxische Lymphozyten, NK Zellen, B-Zellen, NKT-Zellen und professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) (Boehm et al., 1997; Mosmann und Coffman, 1989; Sad und Mosmann, 1995; Schroder et al., 2004). Die Produktion von IFN $\gamma$  wird durch von APCs sekretierte Zytokine, besonders von IL-12 und IL-18 gesteuert (Golab et al., 2000; Otani et al., 1999; Tomura et al., 1998). Zunächst wurde IFN $\gamma$  als proinflammatorisches Zytokin beschrieben (Boehm et al., 1997), aber nach und nach wurde ebenso die protektive Funktion von IFN $\gamma$  entdeckt (Schroder et al., 2004), zum Beispiel in verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Alimi et al., 1998; Ferber et al., 1996; Vermeire et al., 1997)

Biologisch aktiv ist IFN $\gamma$  als Homodimer aus zwei anti-parallel assoziierten Monomeren (Ealick et al., 1991). Dimerisiert bindet es an den IFN $\gamma$  Rezeptor, der ubiquitär exprimiert ist. Jede Untereinheit des Rezeptors interagiert mit einem Mitglied der Janus Kinase (JAK) Familie (Darnell et al., 1994; Ihle und Kerr, 1995); dies sind Nicht-Rezeptor Protein-Tyrosinkinase. Die IFN $\gamma$  Rezeptor Untereinheit 1 (IFNGR1) interagiert mit JAK1 und IFNGR2 mit JAK2 (Bach et al., 1997; Cheng et al., 2004). Der limitierende Schritt innerhalb des IFN $\gamma$ -Signalweges ist die Aktivierung der rezeptorassoziierten JAKs. Dies geschieht in Folge der Dimerisierung und der damit einhergehenden Konformationsänderung der Rezeptoruntereinheiten, ausgelöst durch die Liganden Bindung (IFN $\gamma$ ). Der JAK Aktivierung folgt die Aktivierung verschiedener Transkriptionskoaktivatoren, den STATs (*signal transducer and activator of transcription*). Die größere Untereinheit, IFNGR1 ist notwendig für die IFN $\gamma$  Bindung und der C-Terminus ist an der Bindung von JAK1 und der Phosphorylierung von STAT1 beteiligt. Die kleinere Einheit, IFNGR2 ist für die Signalweiterleitung essentiell und beinhaltet die Bindestelle für JAK2 (Kotenko et al., 1995).

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die Rezeptoruntereinheiten schon vor Ligandenbindung assoziiert vorliegen können (Krause et al., 2002). Erst die Ligandenbindung löst notwendige Konformationsänderungen aus, die dazu führen, dass zytoplasmatische Bindestellen in der Rezeptorkette freigelegt werden. Dies lässt die Assoziation von weiteren Signalwegkomponenten zu. Die Dimerisierung löst die Autophosphorylierung und Aktivierung von JAK2 aus (Briscoe et al., 1996). Der Aktivierung von JAK2 folgt die Transphosphorylierung der JAK1 Moleküle. Durch aktives JAK1 werden spezifische Tyrosinreste der IFNGR1-Kette phosphoryliert, dadurch entstehen Bindestelle für Transkriptionsfaktoren, den STATs (Greenlund et al., 1994). In der IFN $\gamma$  Signalkaskade wird STAT1 aktiviert (Briscoe et al., 1996). Zytosolisches STAT1 bindet zunächst über die SH-Domänen an die freigelegten Bindestellen in der Rezeptorkette. Die STAT Moleküle werden vermutlich durch JAK2 phosphoryliert und somit aktiviert (Briscoe et al., 1996). Die aktivierten Moleküle bilden Homodimere, die sich vom Rezeptor lösen und in den Nukleus translozieren. Die aktiven STAT1 Homodimere werden auch GAF (*gamma interferon activation factor*) genannt und

können spezifisch an spezielle Sequenzen im Genom binden. Diese Sequenzen werden als GAS (*gamma activated site*) und ISRE (*interferon stimulated response element*) bezeichnet und regulieren eine Vielzahl von Genen (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004). Gene, die innerhalb von 15 bis 30 Minuten nach IFN $\gamma$  Stimulation aktiviert werden, werden als primär-responsiv bezeichnet (Kerr und Stark, 1991). Diese primär antwortenden (*responsive*) Gene können wiederum für weitere Transkriptionsfaktoren kodieren, wie zum Beispiel IRF-1 (*interferon regulatory transcription factor 1*). Durch die frühe Aktivierung zusätzlicher Transkriptionsfaktoren wird die Genaktivität zusätzlicher Proteine reguliert: bei ihnen spricht man von sekundär-responsiven Genen (Paludan, 1998).

Durch IFN $\gamma$  werden nicht nur STAT1 Homodimere aktiviert, des Weiteren werden heterodimere Komplexe zwischen STAT1:STAT2 gebildet und heterotrimere Komplexe von STAT1:STAT2:IRF-9 (Bluyssen et al., 1996; Darnell et al., 1994; Matsumoto et al., 1999; Stark et al., 1998). Der heterotrimere Komplex wird auch als ISGF3 bezeichnet und wurde ursprünglich nur im Zusammenhang mit Interferonen des Typ I beschrieben, spielt aber auch eine Rolle in der Kaskade der IFN $\gamma$  Signalübertragung (Matsumoto et al., 1999).

Durch IFN $\gamma$  wird eine Vielzahl von zellulären Effekten induziert. Sie sind sowohl essentiell im Verlauf der angeborenen Immunreaktion, als auch für die Mechanismen der erworbenen Immunität. Im Mittelpunkt stehen die immunstimulierenden und – modulierenden Effekte von IFN $\gamma$  (Schroder et al., 2004). Alle zellulären Mechanismen, die durch IFN $\gamma$  aktiviert werden, können auf eine veränderte Genregulation zurückgeführt werden, eine Vielzahl von Proteinen wird induziert. Darunter fallen Proteine mit direkten anti-pathogenen Effektorfunktionen oder Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung von Zellpopulationen propagieren oder inhibieren (Hertzog et al., 2011; Nathan et al., 1983; Sadler und Williams, 2008). Im Folgenden sollen einige der immunmodulierenden Effekte von IFN $\gamma$  als Beispiele aufgeführt werden.

Obwohl die Typ I Interferone ( $\alpha/\beta$ ) bekannt für ihre antivirale Funktion sind, spielt auch IFN $\gamma$  eine wichtige Rolle während der Abwehr von einigen Viren (Shtrichman und Samuel, 2001). So werden durch IFN $\gamma$  verschiedenste Funktionen und Komponenten in der MHC-I und MHC-II- vermittelten Antigenpräsentation beeinflusst. Die Quantität und die Diversität von präsentierten Antigenen an der Oberfläche wird verbessert und somit das Potenzial vergrößert, dass die MHC Komplexe erkannt werden. Dies wird u.a. durch eine höhere Expression der MHC Komponenten (Boehm et al., 1997; Decker et al., 2002; Fellous et al., 1982), sowie den zur Antigenpräsentation notwendigen Chaperonen Tapasin und GP96 ermöglicht. Des Weiteren wird die lysosomale Aktivität verändert, um mehr Peptide für die Antigenpräsentation prozessieren zu können und die Bindung zwischen Antigen und den MHC-I Komplex zu verbessern (Groettrup et al., 2001; Schroder et al., 2004).

Auch für die Abwehr von Bakterien ist die IFN $\gamma$  Signalkaskade essentiell. Durch die Interaktion mit pathogenen Komponenten (Proteine, DNA, RNA etc.) werden über PRRs, wie TLRs, Signalkaskaden aktiviert, die zur Bekämpfung der entsprechenden Pathogene

wichtig sind. IFN $\gamma$  ist daran beteiligt, die TLR-Signalwege zu amplifizieren, indem es die Transkription beteiligter Rezeptoren und Signalmoleküle positiv reguliert (Hu et al., 2008; Schroder et al., 2006). Aber IFN $\gamma$  kann auch inhibierend auf die Expression von einigen TLR-induzierten Genen wirken (Hu und Barnes, 2006).

Eine wichtige Funktion in der Immunabwehr von verschiedenen Pathogenen nehmen reaktive Sauerstoff- und Nitrogenintermediate ein (Shiloh et al., 1999). Es ist bekannt, dass eine IFN $\gamma$  Stimulation die Aktivität der NADPH-Oxidase erhöht und damit die Produktion von ROS (Prasanna et al., 2007). IFN $\gamma$  induziert außerdem die Expression von NOS2 (iNOS), wodurch die Menge an produzierten Stickoxiden erhöht wird (Malu et al., 2003).

Auch die Differenzierung von B-Zellen wird durch IFN $\gamma$  beeinflusst. Durch IFN $\gamma$  werden die sogenannte Isotypen- und Klassenwechsel (*class switching*) in B-Zellen induziert (Bossie 1991 1902147). Durch den Isotypen- und Klassenwechsel können B-Zellen ein breites Spektrum an Effektorfunktionen abdecken und verschiedene Isotypen von Antikörpern produzieren (Janeway CA, 2001).

Die Aktivität von T-Zellen wird auf vielfältige Weise von IFN $\gamma$  beeinflusst. IFN $\gamma$  zeigte einen direkten Effekt auf T-Zellen, indem es die Funktion von APCs verändert. Außerdem inhibiert IFN $\gamma$  die Antwort aktivierter T-Zellen, indem es die T-Zell-Proliferation durch die induzierte Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welche Tryptophan abbaut, verringert (Berner et al., 2007; Li et al., 2007). Während der T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung werden verschiedene Subtypen produziert, die unterschiedliche Aufgaben übernehmen. So ist auch der IFN $\gamma$ -Einfluss auf die verschiedenen T-Zell-Klassen unterschiedlich. TH1-Zellen, die selbst große Mengen an IFN $\gamma$  produzieren, werden durch die Aktivierung essentieller Transkriptionsfaktoren zur Proliferation angeregt (Khabar und Young, 2007), wohingegen TH2-Zellen und IL-17 produzierende T-Zellen durch IFN $\gamma$  in ihrer Aktivität inhibiert werden.

Die Aktivierung von STAT1 durch IFN $\gamma$  ist nicht kontinuierlich und wird bereits nach einer Stunde inhibiert (Darnell, 1997; Stark et al., 1998). Um eine Überstimulation zu verhindern, wird die Signalkaskade nach IFN $\gamma$ -Stimulation wieder heruntergefahren (Darnell, 1997; Stark et al., 1998). Eine Interaktion mit inhibierenden Molekülen konnte auf allen Ebenen des IFN $\gamma$ -Signalweges gezeigt werden. Der Rezeptorkomplex selbst wird nach Aktivierung internalisiert und tritt in den endosomalen Weg ein (Schreiber und Farrar, 1993). Hierdurch dissoziiert der Komplex (Schreiber und Farrar, 1993), der Rezeptor wird entweder wieder an die Zelloberfläche geführt, in ungebundener und nicht phosphorylierter Form, oder abgebaut, was eine verringerte Sensitivität der Zelle gegenüber IFN $\gamma$  zur Folge hat (Farrar und Schreiber, 1993). Der Ligand wird in beiden Fällen abgebaut (Anderson et al., 1983; Farrar und Schreiber, 1993).

Die Gruppe der am besten beschriebenen negativen Regulatoren des JAK-STAT-Signalweges sind die SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) Proteine. Sie interagieren mit den JAKs und inhibieren somit deren Aktivität (Hilton et al., 1998; Krebs und Hilton, 2001). Weitere Ergebnisse zeigten, dass SOCS-1 auch den Abbau verschiedener Komponenten des Signalweges induzieren kann, indem es sie bindet und für den

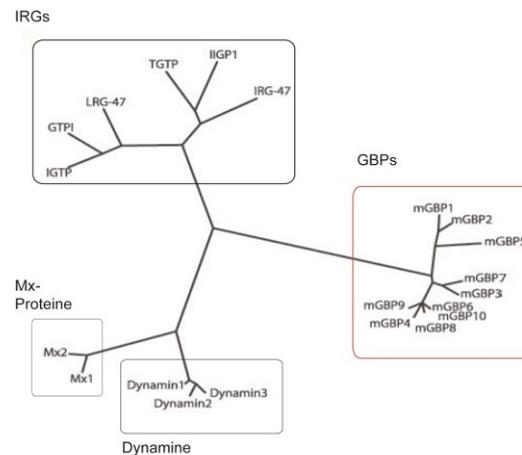
proteasomalen Abbau markiert (Zhang et al., 1999). Zusätzlich wurden den Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP), die eine SH2-Domäne tragen (SHP1, SHP2), als negative Regulatoren des IFN $\gamma$ -Signalweges beschrieben. Sie interagieren mit den JAKs über die SH2-Domäne und dephosphorylieren diese, welches eine Inaktivierung zur Folge hat (Williams und Haque, 1997; You et al., 1999; Yu et al., 2000) Auch im Nukleus kann es noch zu Kontrollmechanismen kommen, hier können STAT-1 Homodimere dephosphoryliert und somit inaktiviert werden (Mowen und David, 2000).

### 1.2.1 IFN $\gamma$ induzierte Effektormechanismen

Die von IFN $\gamma$  induzierten antimikrobiellen Effektormoleküle sind vielfältig. Zum einen werden ROIs und RNIs gebildet (Janeway CA, 2001). Die ROIs werden durch NADPH-Oxidasen generiert und sind Zwischenschritte der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser (Nelson, 2001). Als RNIs werden verschiedene Oxidationsstufen von Stickstoffintermediaten bezeichnet. Diese werden durch NO-Synthasen des Typs 2 katalysiert (Nelson, 2001). Diese Synthasen sind IFN $\gamma$  induzierbar und werden daher als induzierbare NO-Synthase (iNOS) bezeichnet (Shiloh et al., 1999). ROIs und RNIs sind hochreaktive Moleküle und an einer weitgehenden Zerstörung von Nukleinsäuren und einer Vielzahl chemischer Verbindungen beteiligt, sowohl auf Seiten der Pathogene als auch von zelleigenen Strukturen. Daher wird die Produktion streng reguliert. Ein weiteres durch IFN $\gamma$  induziertes Effektormolekül ist die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). IDO baut Tryptophan zu N-Formylkynurenin ab (Burke et al., 1995; Carlin et al., 1987; Hassanain et al., 1993; Hissong und Carlin, 1997). Dadurch wird Tryptophan abgefangen, sodass es in Trp-reiche Proteine mit immunologischer Funktion eingebaut werden kann, außerdem wird es intrazellulären Parasiten dadurch entzogen (Daubener et al., 2001; Pfefferkorn, 1984).

Zu den am besten untersuchten antiviralen, interferon-stimulierten Genen (ISG, *interferon stimulated genes*) gehören die Protein Kinase R (PKR) (Clemens und Elia, 1997) und die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) (Iordanov et al., 2000; Khabar et al., 2000). Sie werden durch virale dsRNA aktiviert. Durch die PKR-Aktivierung kommt es zu einer Unterbrechung der zellulären und viralen Proteinsynthese (Clemens und Elia, 1997). Des Weiteren wird Apoptose durch die PKR induziert und somit werden infizierte Zellen abgebaut und die Virusverbreitung verhindert. Die aktivierte OAS induziert den Abbau zellulärer und viraler mRNAs, sodass auch hier die Proteinsynthese gestoppt wird (Iordanov et al., 2000; Khabar et al., 2000).

Einen Großteil der IFN-induzierten Gene kodiert für GTPasen (Martens und Howard, 2006). Diese können in drei Familien unterschieden werden, siehe Abbildung 1.



**Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der 65 kDa mGBPs, Mx-Proteine, Dynamine (definieren die Eigenschaften der Dynamin-verwandte GTPasen, werden allerdings nicht durch IFN $\gamma$  induziert) und ausgewählter IRGs, nach Degrandi et al 2007.**

Dabei zeigen die Mx Proteine antivirale Eigenschaften (Haller und Kochs, 2011). Die p47 oder *immune related* GTPasen (IRGs) wurden in Makrophagen und Lymphozyten entdeckt (Gilly und Wall, 1992; Lafuse et al., 1995; Sorace et al., 1995). Es konnten im Genom der Maus bis heute 27 Mitglieder der IRG-Familie gefunden werden, wobei vier durch Genduplikation entstandene Pseudogene kodieren (Bekpen et al., 2005; Boehm et al., 1998; MacMicking, 2004; Martens und Howard, 2006; Taylor et al., 1996). Sie zählen zu den primären Genen der IFN-induzierten Immunantwort. Im Vergleich dazu zählt die dritte Familie der IFN $\gamma$  induzierten GTPasen, die p65 oder Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) zu der Sekundärantwort (Boehm et al., 1998). Sie werden IFN $\gamma$ -abhängig unter IRF-1-Kontrolle exprimiert. Sie bilden mit bis zu 20 % einen sehr großen Anteil der IFN $\gamma$ -induzierten Proteine (Martens und Howard, 2006).

Bei vielen IRGs und GBPs werden die antimikrobiellen Eigenschaften ermöglicht, indem sie eine Lokalisationsänderung nach Infektion mit intrazellulären Pathogenen zeigen. Sie können an die Membran von zytosolischen Bakterien oder an die Membran einer parasitophoren Vakuole nach Parasiteninfektion rekrutieren (Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013; Kim et al., 2011; MacMicking, 2004; MacMicking et al., 2003; Martens und Howard, 2006; Singh et al., 2006; Tiwari et al., 2009). Beide GTPasen-Familien zählen zu den wichtigsten antimikrobiellen Effektorproteinen in der Maus. Es wurde bisher nur ein humanes IRG (IRGM) beschrieben, wobei sieben Mitglieder der GBPs und ein Pseudogen beim Menschen gefunden werden konnte (Cheng et al., 1983; Degrandi et al., 2007; Nguyen et al., 2002; Schwemmle et al., 1996). Somit erscheinen die GBPs bezüglich der Abwehr von Infektionen auch beim Menschen von hoher Relevanz.

### 1.2.1.1 p65 murine GBPs

Die GBPs gehören zu den ersten beschriebenen IFN-induzierten Proteinen (Cheng et al., 1983; Gupta et al., 1979; Knight und Korant, 1979). Charakteristisch und

namensgebend ist die Eigenschaft GTP, GDP und GMP mit derselben mikromolaren Affinität binden zu können (Cheng et al., 1985; Cheng et al., 1983). Konservierte Mitglieder der p65 GBP-Familie werden in vielen Vertebraten gefunden (Robertson et al., 2006), beschrieben wurden sie bisher in Mensch, Maus, Ratte, Huhn, Fisch, Frosch und Lanzettfischchen (Asundi et al., 1994; Boehm et al., 1998; Cheng et al., 1991; Li et al., 2009; Nguyen et al., 2002; Schwemmle et al., 1996). Neben IFN $\gamma$  werden die GBPs auch durch Typ I Interferone, IL-1 $\beta$ , Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Lipopolysaccharid (LPS) induziert (Degrandi et al., 2007). Die starke Induktion von GBPs durch IFN $\gamma$  führte früh dazu, dass sie als Hilfsmittel dienten, den IFN $\gamma$ -abhängigen JAK/STAT-Signalweg aufzuklären (Decker et al., 1989; Decker et al., 1991; Lew et al., 1991).

Die p65 GBPs werden der Superfamilie der Dynamin-verwandten Proteine zugeteilt (Praefcke und McMahon, 2004). Innerhalb dieser Familie zeigen die Proteine nur geringe Identitäten in ihrer Primärsequenz, sind aber durch ähnliche strukturelle Eigenschaften und Proteindomänen gekennzeichnet (Praefcke und McMahon, 2004). Dazu zählen die große Guanylat-Nukleotid bindende Domäne, eine sogenannte *middle domain* und eine C-terminale GTPase-Effektordomäne (GED). Eine weitere gemeinsame Eigenschaft ist die von der Oligomerisierung abhängige GTPase-Aktivität (Ferguson und De Camilli, 2012; Praefcke und McMahon, 2004). Im Gegensatz zu den nur halb so großen, kleinen zellulären GTPasen wie H-Ras oder heterotrimeren G-Proteinen, bei denen die GTP-Hydrolyse als kleiner molekularer Schalter dient (Ferguson und De Camilli, 2012; Praefcke und McMahon, 2004), rückt die GTPase-Aktivität bei den GBPs möglicherweise in den Hintergrund (Selleck et al., 2013). Hier könnte die GTPase-Funktion nur der Oligomerisierung dienen und die Proteine könnten als Mechanoenzyme agieren oder als Plattform für die Oligomerisierung mit anderen Effektorproteinen fungieren (Selleck et al., 2013).

Die Proteinstruktur zeigt in der C-terminalen Region amphipathische  $\alpha$ -Helices. Diese bilden Protein-Lipid- oder auch Protein-Protein-Interaktionen aus (Kim et al., 2011; Martens et al., 2004; Tiwari et al., 2009). Zusätzlich enthalten einige GBPs (GBP1, GBP2 und GBP5) ein C-terminales CaaX Motiv (Degrandi et al., 2013), an diesem Motiv kann eine Isoprenylierung stattfinden. Dadurch können Interaktionen mit endosomalen Membranen oder verschiedenen Organellen entstehen (Britzen-Laurent et al., 2010; Modiano et al., 2005; Tripal et al., 2007; Vestal et al., 2000). Mutationen in diesem Bereich führen zu differentieller Lokalisation innerhalb der Zelle und zum Verlust der antimikrobiellen Eigenschaft (Kim et al., 2011; Kravets et al., 2012; Tietzel et al., 2009; Virreira Winter et al., 2011).

Trotz detaillierter struktureller und biochemischer Kenntnisse ist über die biologische Funktion der GBPs noch nicht viel bekannt. Es gibt Daten, die zeigen, dass humanes GBP1 (hGBP1) bei der Regulation der zytokinabhängigen Bildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen (Vaskulogenese) eine Rolle spielt (Gorbacheva et al., 2002; Guenzi et al., 2001; Guenzi et al., 2003). Hier besteht der Zusammenhang, dass hGBP1 durch IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$  induziert wird; diese Zytokine zeigen in der Vaskulogenese

antiproliferative Effekte. Des Weiteren wird hGBP1 durch Wachstumsfaktoren wie den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) reprimiert. (Guenzi et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass hGBP1 die Matrix Metalloproteinase (MMP) herunterreguliert (Guenzi et al., 2003). Diese ist während des Prozesses der Vaskulogenese für den Abbau von extrazellulären Kollagen wichtig (Guenzi et al., 2001; Guenzi et al., 2003). Dieser Prozess ist jedoch unabhängig von der Isoprenylierung oder von der GTPase-Aktivität des Proteins (Guenzi et al., 2003). Im Vergleich dazu wurde die Notwendigkeit der GTPase-Aktivität bei hGBP1 im Zusammenhang mit der Angiogenese von Tumoren in Patienten mit kolorektalem Karzinom beschrieben (Naschberger et al., 2008).

Auch für mGBP2 konnte ein wachstumsregulierender Effekt in NIH 3T3 Fibroblasten gezeigt werden (Gorbacheva et al., 2002). Dieser ist allerdings von einer intakten GTP-Bindestelle abhängig. Des Weiteren wurde für mGBP2 eine inhibierende Funktion bei der zellulären Mobilität von Fibroblasten beschrieben (Messmer-Blust et al., 2010).

Die biologische Relevanz und mechanistische Basis der wachstumsregulierenden Funktion von hGBP1 und mGBP2 sowie die funktionelle Verbindung mit der Interferonantwort bleibt zu klären. Aufgrund der Interferon-induzierten Expression und der sehr hohen intrazellulären Konzentrationen an GBPs nach Interferonstimulation erscheint eine funktionelle Rolle innerhalb der Immunabwehr als wahrscheinlicher.

In der Tat konnte bereits ein geringer antiviraler Effekt gegen vesikuläres Stomatitisvirus (VSV) und Encephalomyocarditis Virus (ECMV) nachgewiesen werden (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Während der Virusinfektion spielen besonders Typ I Interferone eine wichtige Rolle (Janeway CA, 2001). Die hohe Induzierbarkeit der GBPs durch IFN $\gamma$  spricht für eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen prokaryotische und eukaryotische Pathogene, da hier die Immunantwort besonders von IFN $\gamma$  abhängig ist (Degrandi et al., 2007; Janeway CA, 2001). Für einige mGBPs konnte dieses bereits nachgewiesen werden. So wurde eine Rolle für mGBP7 während der Vermittlung der oxidativen Resistenz gegen Mykobakterien beschrieben (Kim et al., 2011). Dabei unterstützt mGBP7 die Assemblierung von Komponenten der Phagozyten-Oxidasen auf Mykobakterien enthaltenden Phagosomen (Kim et al., 2011). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen mGBP7 und mGBP1 und dem Transport monoubiquitiniertes Proteine zu Autolysosomen gezeigt werden. Dabei interagiert mGBP1 direkt mit dem Adapterprotein p62/SQSTM1, dies bindet ubiquitinylierte Proteine und LC3. mGBP7 bindet Atg4b, ein für die Membranelongation der Autophagosomen wichtiges Protein (Kim et al., 2011).

Kürzlich wurde die Funktion von mGBP5 während der Assemblierung des NLRP3-Inflammasoms beschrieben (Shenoy et al., 2012). Das NLRP3-Inflammasom bildet einen Komplex aus verschiedenen Proteinen, das mikrobielle Moleküle erkennt und daraufhin die Caspase-1-Aktivität reguliert, wodurch proinflammatorische Zytokine produziert werden.

Weitere Hinweise für die Rolle der GBPs während der intrazellulären Immunabwehr werden durch die Lokalisation der GBPs in der Zelle unterstützt. Nach IFN $\gamma$ -Stimulation

zeigen die GBPs in der Zelle eine vesikelähnliche Struktur (Degrandi et al., 2007). Diese Vesikel konnten bisher noch nicht genauer identifiziert werden. Nach Infektion mit *T. gondii* zeigen diese eine Lokalisationsänderung und akkumulieren um das Pathogen. Dies konnte für einige GBPs nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*, *Shigella Flexneri* und einigen Subpopulationen von *Salmonella typhimurium* sowie für die Infektion mit *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* (Spekker et al., 2013) gezeigt werden (Degrandi et al., 2007; Kim et al., 2012; Kim et al., 2011; Spekker et al., 2013; Tietzel et al., 2009). Diese Lokalisationsänderungen nach Infektion zeigen, abhängig vom Pathogen, nicht alle GBPs. In Mauszellen wurde gezeigt, dass die mGBP Proteine mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP6 und mGBP7 zu intrazellulären *T. gondii* rekrutiert, wohingegen mGBP5, mGBP8 und mGBP10 nicht rekrutiert werden (Degrandi et al., 2007). Virulente *T. gondii* Stämme (vergleiche Abschnitt 1.3) haben Strategien entwickelt, um der funktionellen Rolle der mGBPs in der Immunabwehr zu entgehen, indem sie die Rekrutierung der mGBPs an die PV verhindern (Degrandi et al., 2007). Die mögliche Rolle von mGBPs in der Infektion mit intrazellulären Parasiten sollte durch die Etablierung einer mGBP2-defizienten Maus in unserem Labor weiter charakterisiert werden. Diese zeigt in der *T. gondii* Infektion *in vivo* eine erhöhte Anfälligkeit, dies ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Morbidität und eine erhöhte Zystenanzahl im Gehirn (Degrandi et al., 2013).

### 1.3 *Toxoplasma gondii*

In der vorliegenden Arbeit wurde *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) als parasitärer Modellorganismus verwendet. Dabei handelt es sich um einen obligat intrazellulären Parasiten, der dem Phylum der Apicomplexa angehört. Die Apicomplexa bilden eine Gruppe unter den Protozoen, die gekennzeichnet sind durch den namensgebenden Apikalkomplex, der aus einem spezialisierten Mikrotubuli-organisierendem Zentrum und speziellen sekretorischen Organellen besteht (Rhoptrien und Microneme), die während der Wirtszellinvasion wichtig sind (Hunter und Sibley, 2012). Der Parasit wurde 1908 von Nicolle und Manceaus aus dem nordafrikanischen Nager *Ctenodactylus gundii* isoliert. Die erste Beschreibung als menschliches Pathogen erfolgte 1939 als eine kongenitale Toxoplasmose bei einem Kind beschrieben wurde (Wolf et al., 1939).

Es können bei den in Europa und Nordamerika verbreiteten Toxoplasmen drei klonale Linien unterschieden werden, sie werden eingeteilt in die Typen I – III (Sibley et al., 2009). Bei humanen *Toxoplasma* Infektionen handelt es sich hauptsächlich um Typ-II Infektionen (Sibley et al., 2009). Charakteristisch für die Stämme ist die unterschiedliche Virulenz im Tiermodell. Typ-I Stämme, wie z.B. BK-Toxoplasmen, gelten im Mausmodell als virulent, sie zeigen eine letale Dosis ( $LD_{100}$ ) von weniger als 10 und bilden nur selten Zysten. Die intermediär virulenten Typ-II Toxoplasmen wie ME49 (Araujo und Slifer, 2003) zeigen im Mausmodell eine  $LD_{50}$  von  $\geq 10^5$  Parasiten (Barragan und Sibley, 2003; Boothroyd und Grigg, 2002; Saeij et al., 2005). Auch Typ-III Toxoplasmen werden durch ihre geringe Virulenz ausgezeichnet. Sie werden nur selten in klinischen Isolaten

gefunden und treten häufig in Tieren auf (Sibley und Howe, 1996). Weitere Unterschiede der Stämme zeigen sich auch in der Zellkultur bezüglich ihres Wachstums und Migrationsverhaltens (Barragan und Sibley, 2003). Die Unterschiede in der Virulenz können u.a. auf Rhoprienproteine (ROPs) zurückgeführt werden. Diese werden von apikal lokalisierten Organellen, den Rhoprien sezerniert (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006).

*T. gondii* zeigt eine geringe Wirtsspezifität, es infiziert eine Vielzahl von warmblütigen Vertebraten und ist weltweit verbreitet, auch in Menschen (Dubey, 2000). Das breite Wirtsspektrum ist auf die Zwischenwirte beschränkt, die sexuelle Vermehrung ist bisher nur in Katzen beschrieben (Dubey et al., 1970; Frenkel, 1970; Jones und Dubey, 2012; Su et al., 2003). Somit bilden Katzen und ihre Verwandten die Endwirte. Es wird angenommen, dass 30 – 70 % der Weltbevölkerung mit *T. gondii* infiziert ist (Dubey, 1987). In immunkompetenten Individuen verläuft eine *T. gondii* Infektion meist asymptomatisch. Kommt es zur Immunsuppression, etwa nach HIV-Infektion oder Organtransplantation, kann eine *T. gondii* Infektion zu schwerwiegenden Komplikationen führen. So kann es während der Toxoplasmose zu Erkrankungen wie Enzephalitis, Retinitis und Myocarditis kommen (Jones et al., 2006; Montoya und Remington, 2008; Pinon et al., 2001). Des Weiteren besteht ein besonderes Risiko bei der konnatalen Infektion von erstinfizierten Schwangeren (Kim und Weiss, 2008; Luft und Remington, 1992). Dabei kommt es zu einer transplazentalen Übertragung des Parasiten von der Mutter auf den Fötus. Dies kann zu schweren Missbildungen und Fehlgeburten führen (Kim und Weiss, 2008; Luft und Remington, 1992).

Aufgrund der beschriebenen Krankheitsbilder und der steigenden Anzahl immunsupprimierter Menschen hat die *T. gondii* Forschung in den letzten Jahren an klinischer Bedeutung gewonnen. Außerdem lassen sich Toxoplasmen, im Vergleich zu anderen Apicomplexa, genetisch leicht manipulieren und in der Zellkultur leicht vermehren. Das macht *T. gondii* zum Modell für verwandte Parasiten wie *Plasmodium*, den Malaria-Erregern und weitere intrazelluläre Erreger, die schwerwiegende opportunistische Infektionen auslösen können (*Eimeria*, *Cryptosporidium*) (Kim und Weiss, 2004).

### **1.3.1 Lebenszyklus von *T. gondii***

Der Parasit zeigt einen komplexen Lebenszyklus, bestehend aus einem sexuellen Zyklus im Endwirt und einem asexuellen Zyklus in den Zwischenwirten. Die Zwischenwirte, inklusive Mensch, können durch die Aufnahme von *T. gondii*-haltigen Gewebezysten in rohem oder nicht ausreichend gegartem Fleisch oder mit Oozysten kontaminierte Nahrung oder Wasser infiziert werden (Jones und Dubey, 2012; Su et al., 2003). Des Weiteren kann die Übertragung über Organtransplantationen (Galvan Ramirez et al., 2006), Bluttransfusionen (Galvan Ramirez et al., 2005) und eine kongenitale Übertragung von der Mutter auf den Fötus erfolgen, was häufig zu fötalen Abnormitäten oder auch Fehlgeburten führen kann (Dubey, 1988).

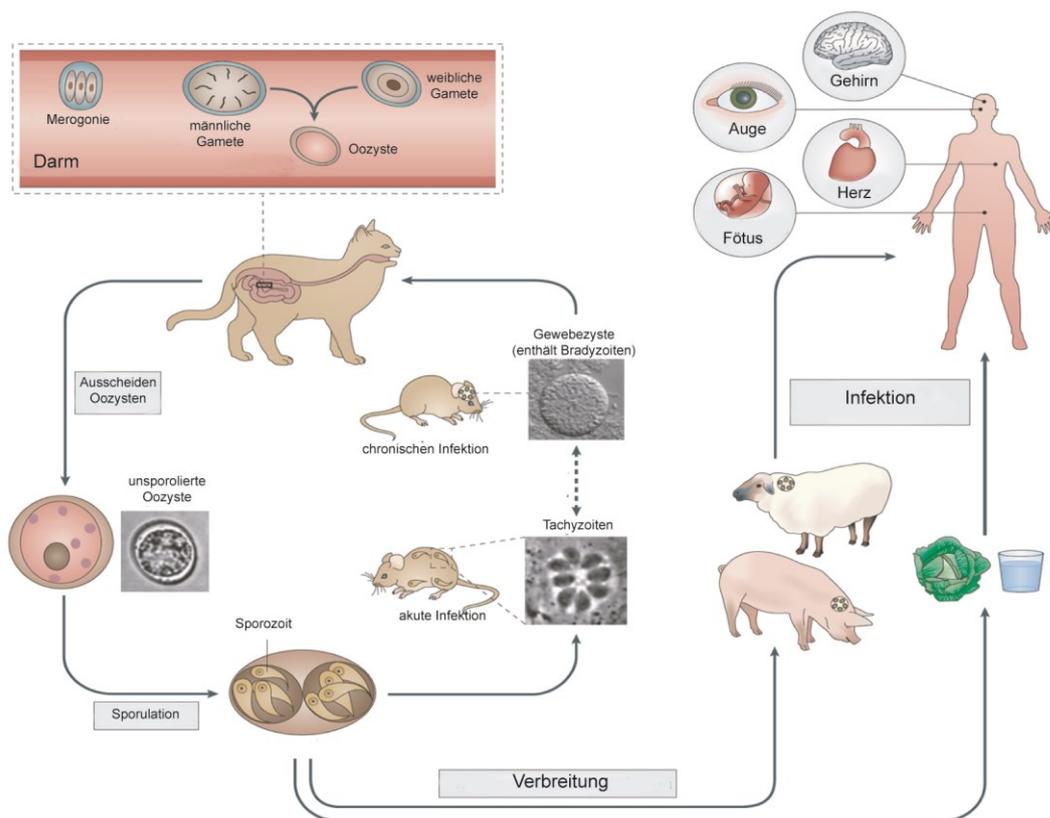


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*. Modifiziert nach (Hunter und Sibley, 2012). Die Abbildung zeigt den sexuellen Zyklus in der Katze, der mit der Ausscheidung von Oozysten endet, diese reifen in der Umwelt zu infektiösen Zysten heran. Durch die Aufnahme der Zysten mittels kontaminierter Nahrung oder Wasser werden die Zwischenwirte infiziert. Des Weiteren kann eine Übertragung über Gewebezysten innerhalb der Wirte durch die Aufnahme von rohem oder ungarem Fleisch erfolgen. Gewebezysten bilden sich häufig in Muskelgewebe, wie dem Herz, im Gehirn oder im Auge. Es kann eine Übertragung von Mutter zum Fötus erfolgen, die mit Fehlentwicklungen und Fehlgeburten einhergeht.

Kommt es zu einer Infektion von Katzen, wird der sexuelle Vermehrungszyklus eingeleitet. Hier entwickeln sich Gametozyten im intestinalen Epithelium (Dubey, 1992). Zwei Gametozyten verschmelzen und bilden eine diploide Oozyste, die zunächst nicht infektiös ist. Die Oozysten werden mit dem Faeces der Katze ausgeschieden und untergehen meiotische Teilungsprozesse in der Umwelt, die mit der Bildung von acht haploiden Sporozoiten endet. Die Sporozoiten können von den Zwischenwirten aufgenommen werden, worauf die asexuelle Vermehrung des Parasiten folgt. Des Weiteren können Zwischenwirte durch die Aufnahme von Gewebezysten aus anderen Zwischenwirten infiziert werden. Im Darm der Zwischenwirte entwickeln sich die Bradyzoiten der Zysten oder die Sporozioiten der Oozysten zu Tachyzoiten, hier invadieren die Parasiten zunächst die Enterozyten (Dünndarmepithelzellen). Sie können aber auch die Epithelgrenze überschreiten und in die Lamina Propria gelangen, von der aus sie weitere Zellen befallen können und auch auf residente Makrophagen, Dendritische Zellen und intraepitheliale Lymphozyten treffen (Buzoni-Gatel und Werts, 2006). Die Vermehrung des Parasiten findet in der parasitophoren Vakuole (PV)

innerhalb der Wirtszelle durch Endodygonie statt. Während der synchron verlaufenden ersten drei bis vier Zellteilungen kommt es zur typischen Rosettenbildung. Aufgrund weiterer Zellteilung wird die Wirtszelle lysiert und Tachyzoiten werden freigesetzt. Von nun an verbreitet sich die Infektion schnell durch die Lymphknoten und weiter in sämtliche Organe des Zwischenwirtes (Dubey, 1988). Das angeborene Immunsystem des Wirtes leitet erste Abwehrmechanismen ein, die schließlich auch das erworbene Immunsystem aktivieren. Der so steigende Druck der Abwehrreaktionen auf die Parasiten, führt zu Differenzierungsprozessen im Parasit und zu der Bildung von Gewebezysten, die aus Bradyzoiten bestehen, die durch ein metabolischen Stillstand charakterisiert sind (Black und Boothroyd, 2000). Die Zystenform beschreibt die latente Infektionsphase und kann nicht weiter vom Immunsystem bekämpft werden, es kann allerdings zu einer Reaktivierung kommen. Bei einer Reaktivierung in immunsupprimierten Individuen kann dies zu einer Encephalitis führen (Boothroyd und Grigg, 2002; Kim und Weiss, 2004; Suzuki und Joh, 1994).

Der Verlauf einer Infektion konnte im Mausmodell gut beschrieben werden (Kim und Weiss, 2004). Nach einer oralen Infektion mit Bradyzoiten, freigesetzt aus Zysten, penetrieren diese innerhalb von zwei Stunden die Enterozyten des Dünndarmepithels und differenzieren innerhalb von 18 Stunden nach Infektion zu Tachyzoiten. In verschiedenen Organen wie Lunge und Gehirn, lassen sich nach vier Tagen Parasiten nachweisen (Dubey, 1997). Kleine Zysten können bereits nach sechs Tagen festgestellt werden (Weiss und Kim, 2000). Die Zystengröße variiert je nach Alter und enthaltenen Parasiten, es wurden kleine Zystengröße (5µm) mit nur zwei Parasiten beschrieben, aber da sich die Bradyzoiten auch langsam weiter teilen, können auch große Zysten (70µm) mit bis zu tausend Parasiten beobachtet werden (Kim und Weiss, 2004).

### **1.3.2 Genom und Struktur der Tachyzoiten und Bradyzoiten**

Das *T. gondii* Genom umfasst ca. 87 Mb, welche auf 14 Chromosomen verteilt sind (Reid et al., 2012). Zusätzlich besitzt *T. gondii* ein 6 kb mitochondriales Genom in zwei DNA-haltigen Organellen und ein 35 kb episomales plastidenähnliches Genom im Apicoplasten (Kissinger et al., 2003). Dabei handelt es sich um ein Organell das in vielen Apicomplexa-Vertretern gefunden wurde (Ajioka et al., 2001; Kohler et al., 1997) und homolog zu Plastiden in photosynthetischen Organismen ist. Es wird vermutet, dass hier die Synthese von aromatischen Amino- und Fettsäuren stattfindet (Fichera und Roos, 1997; Kohler et al., 1997; Roberts et al., 1998). Phylogenetische Untersuchungen verschiedener Apicomplexa lassen vermuten, dass die Apicoplasten wahrscheinlich durch sekundäre Endosymbiose einer Grün- oder Rotalge entstanden sind (Kohler et al., 1997).

Tachyzoiten und Bradyzoiten unterscheiden sich strukturell nur geringfügig. Die Parasiten sind etwa 2 x 6 µm groß und zeigen eine leicht gebogene Form auf. Im Vergleich zu den Tachyzoiten sind die Bradyzoiten etwas schmaler (Dubey et al., 1998). Der Organismus wird von drei Membranen umgeben, einem sogenannten Pellikel

(Dubey et al., 1998). Dabei wird die Plasmamembran von zwei dicht beieinander liegenden Membranen unterschieden, die den inneren Membrankomplex bilden. Charakteristisch für die Apicomplexa sind das Konoid und zwei sekretorische Organellen, den Mikronemen und Rhoptrien, am apikalen Pol des Parasiten (Dubey et al., 1998). Dabei ist der Konoid eine Struktur aus spiralförmig gewundenen Tubulinpolymeren. Diese können in extrazellulären Parasiten ausgefahren werden und durch ihre Rotation zur Fortbewegung beitragen (Hu et al., 2002). Durch die Form der Rhoptrien lassen sich Tachyzoiten und Bradyzoiten unterscheiden. Die in den Tachyzoiten keulenförmigen Strukturen bilden im Stadium der Bradyzoiten häufig eine Schleife aus (Dubey et al., 1998). Die übrigen Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum verteilen sich innerhalb der Zelle. Weitere sekretorische Organellen bilden die dichte Granula, diese sind im Gegensatz zu den anderen sekretorischen Organellen, den Rhoptrien und Mikronemen, innerhalb der Zelle verteilt und nicht am apikalen Pol kondensiert. Der Zellkern befindet sich bei den Tachyzoiten in der Mitte der Zelle, während dieser während des Bradyzoitenstadiums am posterioren Pol lokalisiert ist. Ein weiteres Merkmal der Bradyzoiten ist das Vorhandensein vieler amylopektinhaltiger Granula, die nur in geringen Mengen in Tachyzoiten zu finden sind (Dubey et al., 1998).

### **1.3.3 Interaktionen mit dem Wirt**

Die frühen und essentiellen Interaktionen mit dem Wirt sind die Zelladhärenz und die Invasion in die Wirtszelle. Hierbei spielen die Organellen des Apikalkomplexes, Mikronemen, Rhoptrien und dichte Granula eine wichtige Rolle (Carruthers und Boothroyd, 2007). Das Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle ist ein aktiver, vom Parasit gesteuerter Prozess und ist unabhängig von der Phagozytose der Wirtszelle (Dobrowolski und Sibley, 1996; Dubremetz et al., 1998).

#### **1.3.3.1 Invasion und Bildung der PV**

*T. gondii* kann jede kernhaltige Zelle infizieren, ein initialer Kontakt entsteht wahrscheinlich mittels GPI-verankerter Moleküle auf der Oberfläche der Parasiten an einen glykosylierten Rezeptor auf der Wirtszellmembran (Fourmaux et al., 1996; Mineo et al., 1993; Ortega-Barria und Boothroyd, 1999). Ein genauer Mechanismus wurde allerdings noch nicht beschrieben. Eine Theorie besagt, dass der Parasit seinen eigenen „Anker“ zunächst in die Zelle sekretiert (Boothroyd und Dubremetz, 2008). Dadurch entsteht ein Kontakt zwischen Zytoskelett und Zellmembran der Wirtszelle. Denn nur durch einen festen Kontakt ist das Eindringen in die Zelle möglich. Der Kontakt zwischen Parasiten und Wirtszellmembran geschieht über die Bildung einer ringförmigen Struktur, der *moving junction* (MJ) oder auch *tight junction* (Michel et al., 1980). Dies bezeichnet die lokal begrenzte Kontaktstelle zwischen den Membranen von Wirt und Parasit, hier wird die Wirtszellmembran während der Invasion des Parasiten eingestülpt, sodass die PV entsteht und den eindringenden Parasiten letztendlich umgibt. Die PV wurde 1964

von Dubuy beschrieben (Dubuy et al., 1964). Durch Versuche mit membrangängigen, fluoreszierenden Derivaten von Tetrazyklin konnte gezeigt werden, dass die Parasiten sich vom Wirtszytosol in einem eigenem Kompartiment abgrenzen. Die Membran der PV (PVM) funktioniert als molekulares Sieb, sie ist durchlässig für Moleküle zwischen 13 und 19 kDa (Schwab et al., 1994) und es wird vermutet, dass es Poren gibt, die selektiv Nährstoffe auf- und Stoffwechselprodukte abgeben (Schwab et al., 1994).

Der Vorgang der Invasion dauert nur ca. 10s (Carruthers und Sibley, 1999; Sibley und Andrews, 2000; Smith, 1995). Während dieses Prozesses ist die *moving junction* auch eine Art „Molekularsieb“, das heißt die Proteinbestandteile der Membran, die letztendlich die PV-Membran bildet, werden selektiv entfernt (Mordue et al., 1999; Suss-Toby et al., 1996). Dadurch wird auch die nichtfusionierende Eigenschaft der PV bestimmt und somit die Verschmelzung mit dem Lysosom verhindert (Charron und Sibley, 2004; Joiner et al., 1990; Mordue et al., 1999; Sibley et al., 1985).

### 1.3.3.2 Die sekretorischen Organellen

Die Proteine der Mikronemen (MIC Proteine) sind für die Initiation des Invasionsprozesses wichtig, sie steuern die gerichtete Adhäsion des Parasiten an die Wirtszelle und gewährleisten die Bildung der *moving junction* (Lovett et al., 2002) Dabei erfolgt die Ausschüttung nach dem initialen Kontakt zwischen Wirt und Parasit und ist abhängig von der Anreicherung von Kalzium im parasitären Zytosol (Carruthers und Sibley, 1999). Des Weiteren ermöglicht die Sekretion von MIC Proteinen eine substratabhängige gleitende Fortbewegung der Parasiten über kurze Strecken, um benachbarte Zellen zu infizieren (Sibley et al., 1998).

Der Inhalt der Rhoptrien wird in die entstehende PV sezerniert. Es wurden bisher 29 ROP Proteine beschrieben (Boothroyd und Dubremetz, 2008). Sie werden in 24 Rhoptry *bulb* Proteine (ROP) und 5 Rhoptry *neck* (dann auch als RON bezeichnete) Proteine unterschieden (Boothroyd und Dubremetz, 2008). Ein großer Teil der ROP Proteine zeigt Homologien zu Kinasen (El Hajj et al., 2006) und für einige Mitglieder wie ROP18 wurde eine Serin-Theronin Kinase-Aktivität nachgewiesen (El Hajj et al., 2006; El Hajj et al., 2007; Fentress und Sibley, 2011). Dennoch wird vermutet, dass es sich bei den meisten ROP Proteinen um Pseudokinasen handelt und diese eine andere Funktion erfüllen könnten (Carey et al., 2004), wie zum Beispiel eine stabilisierende Funktion während der Aktivierung anderer ROPs (Behnke et al., 2011). Die Funktion der meisten ROP Proteine ist noch ungeklärt. Auch der Mechanismus durch den die Proteine sezerniert werden, ist noch nicht bekannt, der Auslöser ist die Erkennung der Wirtsmembran und es kommt wahrscheinlich zu einer Fusion und so zu einer Art Exozytose der Proteine. Dabei werden einige Proteine „frei“ in das Wirtszytosol sezerniert, andere ROP Proteine sind in vesikelähnlichen Strukturen assoziiert (Boothroyd und Dubremetz, 2008).

Für viele *T. gondii* RON Proteine gibt es orthologe Proteine in den anderen Apicomplexa. Daher wird vermutet, dass sie für einen Prozess wichtig sind, der allgemein bedeutend für die Infektion von Wirtszellen durch Apicomplexa ist (Bradley et al., 2005). Sie assoziieren mit Proteinkomplexen an der *moving junction* (Alexander et al., 2005; Lebrun

et al., 2005). Im Vergleich zu den RON werden die Rhoptrien *bulk* Proteine auch in die Wirtszelle sezerniert, bilden aber keine komplexen Strukturen an der *moving junction*, sondern werden im Wirtszellzytoplasma, in der PVM oder in der PV gefunden (Boothroyd und Dubremetz, 2008).

Ein Beispiel für ein in der Vakuole verbleibendes Protein ist ROP1 (Ossorio et al., 1992). Einige der Rhoptrien Proteine (ROP) wie ROP2 werden in die PVM eingelagert (Saffer et al., 1992). Für ROP2 konnte gezeigt werden, dass es dafür verantwortlich ist, dass die PV des Parasiten mit ER und Mitochondrien der Wirtszelle assoziiert (Sinai und Joiner, 2001; Sinai et al., 1997). Andere ROP Proteine werden in die PVM eingelagert und zeigen Aktivität auf der Wirtsseite der Membran. Ein Vertreter hierfür ist ROP18. Es konnte gezeigt werden, dass ROP18 Proteine im Wirtszytosol phosphoryliert (El Hajj et al., 2006; Molestina et al., 2003). Eine weitere Gruppe der ROP Proteine, wie ROP16 und PP2C-hn wandern nach Translokation in das Wirtszellzytoplasma in den Kern der Wirtszelle. Ihre Funktion hier ist noch nicht hinreichend geklärt (Bradley et al., 2005; Gilbert et al., 2007). Für ROP16 konnte gezeigt werden, dass es die Genexpression der Wirtszelle beeinträchtigt (Bradley et al., 2005). Die ROP Proteine nehmen eine besondere Rolle innerhalb der von *T. gondii* sezernierten Proteine ein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Virulenzunterschiede von einzelnen *T. gondii* Stämmen auf unterschiedliche ROP Proteine zurückzuführen sind (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006).

Die Proteine der Mikroneme und Rhoptrien werden nur während der Invasion sezerniert. Im Vergleich dazu, werden die Proteine der dichten Granula kurz nach der Invasion und über den gesamten Zeitraum in die PV sezerniert (Dubremetz et al., 1993; Leriche und Dubremetz, 1990). Die einzelnen Funktionen der verschiedenen GRA Proteine sind noch nicht genau geklärt, aber sie sind wichtig für den Nährstofftransport, für die Abgabe von Stoffwechselprodukten, für die Ausbildung des intravakuolären Netzwerkes tubulärer Membranen und für diverse Modifizierungen der PV (Achbarou et al., 1991; Cesbron-Delauw, 1994; Mercier et al., 2002; Sibley et al., 1994).

### **1.3.3.3 Wechselwirkungen zwischen intrazellulären *T. gondii* und der Wirtszelle**

Die Fähigkeit des Parasiten innerhalb der Wirtszelle zu replizieren und einer Immunabwehr des Wirtes zu entgehen macht es zwingend notwendig, dass der Parasit verschiedene Signalwege in der Wirtszelle moduliert. *T. gondii* interagiert und manipuliert viele Ebenen der intrazellulären Signalwege der Wirtszelle. Dabei können die unterschiedlichen Wege der Kommunikation zwischen Wirt und Parasit in zwei Typen unterteilt werden. Zum einem die für den Parasiten kritische, die essentiell für das Wachstum und die Vermehrung ist und bei allen Parasitenstämme gleich ist (Hunter und Sibley, 2012). Zum Anderem zählen die Interaktionen, die sich innerhalb der verschiedenen Toxoplasmen-Stämme unterscheiden und daher auch wahrscheinlich für

die stammspezifischen Virulenzunterschiede verantwortlich sind (Hunter und Sibley, 2012).

Es beginnt damit, dass die Zusammensetzung der Wirtsmembran während des Invasionsprozesses verändert wird, sodass diese später nicht als Teil des lysosomalen Abbauweges mit den Lysosomen verschmilzt und es dadurch zum Abbau des Parasiten kommen würde (Joiner et al., 1990; Jones und Hirsch, 1972; Jones et al., 1972). Im Verlauf der Infektion der Wirtszelle kommt es zu einer engen Assoziation von Wirtszellorganellen wie dem ER und Mitochondrien mit der PV des Parasiten (Jones und Hirsch, 1972). Die Lokalisation der Organellen um die PV herum, ist abhängig von den wirtseigenen Mikrotubuli (Sinai et al., 1997). Viele metabolische Wege der Wirtszelle sind wichtig für die intrazellulären Toxoplasmen. Sie fangen Nährstoffe, Lipide und weitere molekulare Grundgerüste ab und nutzen diese für ihre eigenen Synthesewege (Boyle und Radke, 2009). Die Zugänglichkeit erfolgt dabei über das Mikrotubulinetzwerk des Wirtes und auch durch Interaktionen mit Endolysosomen, diese werden via Invagination von der PV aufgenommen (Coppens et al., 2006).

Besonders wichtig für die Dynamik von Plasmamembranen ist auch das Zytoskelett (Sheetz et al., 2006). Sowohl das parasitäre Zytoskelett als auch das Wirtszytoskelett spielen eine wichtige Rolle während der Invasion der Parasiten. Verschiedene Rhoptrien Proteine der Toxoplasmen beeinflussen das Wirtszytoskelett. Zum Beispiel interagiert Toxofilin mit dem Aktinzytoskelett und trägt dazu bei, dass die Organisation verändert wird, sodass Platz für die PV geschaffen wird (Delorme-Walker et al., 2012). Das Mikrotubulizytoskelett des Wirtes wurde weitgehend untersucht bezüglich seiner Rolle während der rezeptorvermittelten Endozytose als auch während bakteriellen und viralen Infektionen, wobei die Mikrotubuli als Transportbahnen von der Zellperipherie ins Zentrum dienen (Damm et al., 2005; Parton et al., 1994; Sodeik et al., 1997; Yoshida und Sasakawa, 2003). Konsistent dazu ist das Mikrotubulinetzwerk des Wirtes auch wichtig für den Transport von in die Zelle sezernierten ROP Proteinen (Hakansson et al., 2001). Die genaue Funktionalität des Wirtsmikrotubulinetzwerkes während der *T. gondii* Invasion konnte noch nicht gezeigt werden. Aber es kommt zu einer temporären Abhängigkeit des Parasiten vom Mikrotubulizytoskelett des Wirtes und durch die Zerstörung des Wirtsmikrotubulinetzwerkes kommt es zu einer verringerten Invasion von *T. gondii*. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zeit für den Vorgang der Invasion durch ein intaktes Wirtsmikrotubulinetzwerk verkürzt wird (Sweeney et al., 2010).

#### **1.3.3.4 Aktivierung des Immunsystems nach *T. gondii* Infektion**

Die Infektion mit *T. gondii* führt zu einer Aktivierung des Immunsystems, gleichzeitig hat *T. gondii* Mechanismen entwickelt, dieser Aktivierung entgegen zu wirken. Die antiparasitäre Immunantwort auf eine *T. gondii* Infektion ist gekennzeichnet durch die IL-12 Produktion von dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Durch die IL-12-Produktion werden T-Zellen und NK-Zellen zur IFN $\gamma$ -Produktion angeregt (Gazzinelli et al., 1993; Hunter et al., 1994; Johnson, 1992; Khan et

al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die IL-12-Produktion abhängig von CCR5- und TLR-Signalen sind (Aliberti et al., 2003; LaRosa et al., 2008; Scanga et al., 2002; Yarovinsky et al., 2005). Der Chemokinrezeptor CCR5 wird auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, inklusive Makrophagen und Dendritischen Zellen (Mueller und Strange, 2004). Mäuse, die den CCR5-Rezeptor nicht exprimieren, zeigen eine deutlich verringerte IL-12-Antwort nach *T. gondii*-Infektion (Aliberti et al., 2000). Das *Toxoplasma*-Protein Cyklophilin-18 (C18) wurde als möglicher Ligand für den Rezeptor identifiziert, aber nach Aufreinigung war der Effekt von C18 bezüglich der IL-12-Produktion gering, sodass es weitere Liganden für den CCR5-Rezeptor geben muss (Aliberti et al., 2003). Wichtiger für die Erkennung von *T. gondii* scheinen die ubiquitär exprimierten Toll-like-Rezeptoren (TLR) zu sein (LaRosa et al., 2008). Denn ein knock out im TLR-Adapterprotein MyD88 erhöht die Anfälligkeit gegenüber *T. gondii* (LaRosa et al., 2008). Die Inaktivierung einzelner TLRs hatte nur einen geringen Effekt bezüglich des Verlaufs einer *T. gondii*-Infektion, sodass die Funktionen einzelner TLRs in der *T. gondii* Erkennung womöglich redundant sind und/oder eine Aktivierung mehrerer TLRs gleichzeitig wichtig ist. Es wird auch vermutet, dass MyD88 wichtig für die Signalweiterleitung anderer Rezeptoren ist, wie dem IL-1R und dem IL-18R. Beide interagieren mit MyD88 und ihre Liganden werden nach *T. gondii* Infektion hochreguliert (Adachi et al., 1998; Cai et al., 2000; Chang et al., 1990; Hunter und Remington, 1995; Mordue et al., 2001). Es konnten auch *T. gondii* abgeleitete Liganden für TLRs identifiziert werden, wie *T. gondii* Profilin für TLR11 und TLR12, und HSP70 und GPI-verankerte Proteine für TLR2 und TLR4 (Debierre-Grockiego et al., 2007; Koblansky et al., 2013; Mun et al., 2005; Yarovinsky et al., 2005).

Das wichtigste an der Erkennung des Parasiten durch angeborene Immunrezeptoren ist die anschließende Signalkaskade und letztendlich die Produktion von IL-12, welches entscheidend ist für die Induktion von IFN $\gamma$  und die Bekämpfung der *T. gondii* Infektion. Die Bedeutung von IFN $\gamma$  in der Abwehr von *T. gondii* zeigt sich in der IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> Maus und in der IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Maus, beide sind hoch suszeptibel gegenüber einer *T. gondii* Infektion (Deckert-Schluter et al., 1996; Scharon-Kersten et al., 1996). Durch IFN $\gamma$  werden verschiedene Effektormechanismen aktiviert, die sehr wichtig für die Bekämpfung der Infektion sind. Wie unter 1.2 erwähnt, zählen IFN $\gamma$ -induzierte GTPasen (GBPs und IRGs), iNOS undIDO dazu (Collazo et al., 2001; Degrandi et al., 2007; Pfefferkorn, 1984; Scharon-Kersten et al., 1997). Diese Proteine tragen dazu bei, dass das parasitäre Wachstum durch verschiedene Mechanismen gehemmt wird (siehe 1.2). Da diese IFN $\gamma$ -induzierten Effektormechanismen einen großen Effekt auf das intrazelluläre Wachstum von *T. gondii* haben, hat der Parasit Strategien entwickelt, die IFN $\gamma$ -Signalkaskade zu beeinflussen (Lang et al., 2007). Der Parasit hat Strategien entwickelt, um die STAT1-abhängige Transkription von IFN $\gamma$ -induzierten Effektormolekülen zu inhibieren. Es wurde gezeigt, dass *T. gondii* die STAT1 Hochregulation inhibiert, indem es STAT1-Suppressoren (SOCS-Proteine) hochreguliert (Schneider et al., 2013; Zimmermann et al., 2006). Gleichzeitig wird die Aktivität von STAT3 erhöht, um die IL-12-Synthese weiter zu unterdrücken (Butcher et al., 2005). Auch andere immunrelevante

Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B werden in murinen Makrophagen nach *T. gondii* Infektion inhibiert (Butcher et al., 2001; Shapira et al., 2002).

Obwohl der Parasit versucht die Signalwege des Wirtes zu beeinflussen, um die Aktivierung des Immunsystems zu unterlaufen, werden durch die Infektion mit *T. gondii* verschiedene proinflammatorische Signalwege aktiviert. Auch extrazelluläre Parasiten oder Parasitenbestandteile können Signalwege in der Wirtszelle aktivieren, wie die *Mitogen-aktivierte Protein Kinase* (MAPK) ERK1/2 (*extracellular-signal regulated Kinase*) (Abi Abdallah et al., 2012; Kim und Denkers, 2006; Valere et al., 2003). Die MAP-Kinasen sind für die Regulierung der IL-12-Antwort in Makrophagen wichtig (Kim et al., 2005; Mason et al., 2004).

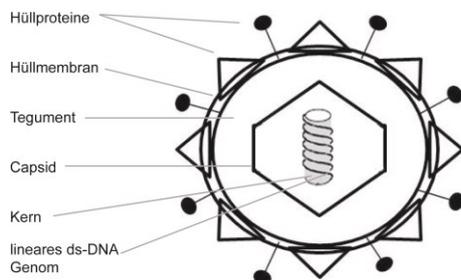
Viele Faktoren, die die Signalwege miteinander verbinden, die nach *T. gondii* Infektion aktiviert werden, sind noch unbekannt. Eine Verbindung könnten intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Level sein. Die Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$  als sekundärer Signalgeber (*second messenger*) in fundamentalen zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Proliferation und Zelltod ist schon lange bekannt (Berridge et al., 2000). In den vergangenen Jahren wuchsen die Kenntnisse zur Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  als *second messenger* auch im Zusammenhang mit immunologischen Funktionen. Die enge Assoziation der *T. gondii* PV mit  $\text{Ca}^{2+}$  regulierenden Organellen wie dem ER und den Mitochondrien (Sinai et al., 1997), könnte ein Hinweis sein, dass  $\text{Ca}^{2+}$  ein Bindeglied zwischen den durch *T. gondii* Infektion aktivierten Signalwegen ist. Es konnte gezeigt werden, dass  $\text{Ca}^{2+}$  wichtig für die Aktivierung von MAPK-Signalwegen ist (Masek et al., 2006), wodurch letztendlich entzündungsfördernde Faktoren produziert werden. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass *T. gondii* schnell nach Invasion  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig die Proteinkinase C aktiviert, die wiederum MAPK aktivieren kann und somit zu erhöhter IL-12-Produktion führt (Masek et al., 2006; Weller et al., 1960).

## 1.4 MCMV

Das Cytomegalovirus (CMV) wird der Familie der Herpesviren (Herpesviridae) zugeordnet (Krmptotic et al., 2003). Der Name wurde von der Eigenschaft abgeleitet, dass sich infizierte Zellen drastisch vergrößern (Weller et al., 1960), dies wird als „Cytomegalie“ bezeichnet. Die Familienzuordnung erfolgt primär anhand der Viruspartikelmorphologie (Plummer, 1967). Beispiele für humanpathogene Vertreter der Familie sind die Herpes-Simplex-Viren (HSV)-1 und -2, Varizella-Zoster-Virus (VZV), die humanen Herpesviren (HHV)-6 und -7, Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (HHV-8) (Roizman, 1982). Eine gemeinsame Eigenschaft innerhalb der Familie ist die Ausbildung einer lebenslangen, latenten Infektion im Wirtsorganismus (Roizman und Baines, 1991). Die weitere Einteilung in die drei Unterfamilien  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesvirinae (Pellet, 2006) erfolgt über Eigenschaften wie Replikationsgeschwindigkeit, Zelltropismus, Wirtsspektrum sowie Ort ihrer Latenz (Krmptotic et al., 2003). Das Cytomegalovirus zählt zu den  $\beta$ -Herpesviren, diese sind ausgezeichnet durch ein enges Wirtsspektrum und einen langen Replikationszyklus. Zudem sind sie in Endothelzellen, in Monozyten und in Makrophagen Vorläuferzellen

latent zu finden (Roizman, 1996). Latentes humanes CMV (hCMV) ist in unterschiedlichen Organen wie Lunge, Leber, Pankreas, Niere und Herz anzutreffen (Koffron et al., 1997). Im Vergleich dazu etabliert murines CMV (mCMV) Latenz zusätzlich in Milz, Speicheldrüsen, Nebenniere und nicht im Pankreas (Baltesen et al., 1993; Collins et al., 1993; Klotman et al., 1990; Reddehase et al., 1994).

Die Viruspartikel der Familie der Herpesviridae haben einen Durchmesser von 150-200 nm (Griffiths und Grundy, 1987). Ein Partikel besteht aus einem Kern (*core*), der die lineare, doppelsträngige DNA enthält (Roizman, 1996). Diese ist mit einer fibrillären Proteinmatrix assoziiert. Die DNA ist von einem ikosaedrischen Capsid umhüllt, der Bereich zwischen Capsid und der Hüllmembran wird als das Tegument bezeichnet. Das Tegument enthält eine Proteinmatrix, einige Proteine dieser Matrix übernehmen eine regulatorische Funktion während der frühen Infektionsphase. Abschließend umgibt eine Glykoprotein enthaltende Hüllmembran das Viruspartikel (Roizman, 1996).



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Herpesvirions.** Das Virion besteht aus der linearen, doppelsträngigen DNA. Diese ist mit dem Kern (*core*) assoziiert und von einem ikosaedrischen Capsid umgeben. Im Raum zwischen Capsid und Hüllmembran, dem Tegument sind virale Glykoproteine eingelagert.

Der lytische Infektionszyklus der Herpesviren beginnt mit dem Eindringen der Virionen in die Zelle. Die Adsorption des Virions erfolgt dabei über Oberflächenrezeptoren und es folgt die Verschmelzung der Virus- und Wirtszellmembran (Mocarski, 1996). Tegument und Capsid gelangen somit in das Zytoplasma der Wirtszelle. Das Capsid wird entlang der Mikrotubuli zum Kern transportiert, hier gelangt das Virusgenom durch eine Kernpore ins Nukleoplasma und zirkularisiert hier zu einem Episom. Im Zellkern startet die Synthese der *immediate early*-(IE) Gene. Diese kodieren für regulatorische Proteine, welche wiederum die *early* (E)-Gene aktivieren. Durch die E-Gene werden Proteine, welche wichtig für die DNA-Replikation sind, kodiert. Während die Virus-DNA synthetisiert wird, werden auch die späten (*late*, L) Gene transkribiert. Diese kodieren für Glykoproteine, die für die Bildung und den Zusammenbau der neuen Virionen benötigt werden. Noch im Zellkern assemblieren Capsid, DNA und Tegumentproteine mit der inneren Kernmembran. Daraufhin stülpt sich die Kernmembran aus und das Viruspartikel wird über den sekretorischen Weg der Wirtszelle über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (Arvin A., 2007; Mocarski, 1996). Das Genom der Cytomegaloviren ist ca. 230 kb groß und kann potenziell 200 Genprodukte bilden (Arvin A., 2007). Während der für die Cytomegaloviren charakteristische Latenz werden nur wenige virale Proteine synthetisiert (Arvin A., 2007). In dieser Phase wird das Virusgenom parallel zum Wirtszellgenom repliziert und es kann durch Stress, Immunsuppression und durch weitere äußere Faktoren zu einer Reaktivierung des Virions kommen (Arvin A., 2007).

Das Wirtsspektrum der Cytomegaloviren ist sehr eng und beschränkt sich auf eine Spezies, so kann humanpathogenes CMV in keinem Tiermodell untersucht werden. Dennoch kann das murine CMV als Modell für hCMV genutzt werden, da der Infektionsverlauf und die Etablierung der Latenz der Viren in den entsprechenden Wirten sehr ähnlich ist (Hudson, 1979). Der Verlauf einer experimentellen Infektion ist abhängig von der Infektionsdosis, der Applikationsmethode, der Virusherkunft (in der Zellkultur oder aus Speicheldrüsen infizierter Mäuse gewonnen), Alter, Immunstatus und genetischer Hintergrund der Mäuse (Krpmotic et al., 2003). Die Infektion mit  $1 \cdot 10^5$  infektiösen Viruspartikeln (*plaque forming units*, PFUs), die aus der Zellkultur gewonnen wurden, verläuft in immunkompetenten, adulten Mäusen asymptomatisch (Krpmotic et al., 2003). Nur wenige Viren können in verschiedenen Organen gefunden werden (Krpmotic et al., 2003). Nur in den Speicheldrüsen manifestiert sich die Infektion für einen Zeitraum von 3 - 4 Wochen. In immunsupprimierten Mäusen manifestieren sich verschiedene Krankheitsbilder nach Infektion. Es kann zu Pneumonie (Brody und Craighead, 1974; Reddehase et al., 1985), Hepatitis (Bolger et al., 1999) und Entzündungen der Nebenniere (Smith und Wehner, 1980) kommen.

Die Kontrolle einer mCMV-Infektion verläuft in der frühen Phase über die Aktivität der NK-Zellen (Welsh et al., 1994). Die Besonderheit der NK-Zellen im frühen Infektionsverlauf zeigt sich in verschiedenen Studien mit NK-Zell-defizienten oder –depletierten, mCMV-infizierten Mäusen. Durch diese Studien konnte gezeigt werden, dass die NK-Zellen die Virusreplikation in verschiedenen Organen inhibieren (Welsh et al., 1991). Die genetisch determinierte mCMV-Suszeptibilität von BALB/c und C57BL/6-Mäusen stellt eine Besonderheit der NK-Zell-Kontrolle der Infektion dar. Der Unterschied zwischen mCMV-suszeptiblen BALB/c-Mäusen und mCMV-resistenten C57BL/6 Mäusen ist bedingt durch unterschiedliche NK-Zell Aktivitäten (Scalzo, 2002). Diese fällt in den BALB/c Mäusen schwächer aus, die daraufhin eine erhöhte Anfälligkeit zeigen (Scalzo, 2002). Die Aktivierung von NK-Zellen verläuft über eine Kombination von aktivierenden und inhibierenden Signalen, die über aktivierende bzw. inhibierende Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche aufgenommen werden. Die Resistenz der C57BL/6-Mäuse kann auf ein Allel zurückgeführt werden, das innerhalb des NK-Lokus liegt und als *Cmv1*-Region bezeichnet wird. Dies kodiert für den aktivierenden NK-Zellrezeptor Ly49H (Brown et al., 2001; Daniels et al., 2001; Lee et al., 2001). Als Ligand für den Rezeptor dient das virale Genprodukt m157, dies wird auf der Oberfläche von mCMV-infizierten Zellen präsentiert und kann durch NK-Zellen, die Ly49H exprimieren, erkannt werden. Eine Interaktion des NK-Zell Rezeptors Ly49H mit dem viralen Liganden m157 führt zur Apoptose der infizierten Zellen (Arase et al., 2002). Weitere Untersuchungen unterstützen die Bedeutung der NK-Zell vermittelten Immunantwort gegen die mCMV-Infektion. Hierbei konnten drei virale Gene identifiziert werden, die die Expression eines NK-Rezeptor-aktivierenden Liganden supprimieren (Hasan et al., 2005; Krmpotic et al., 2002; Krmpotic et al., 2005; Lodoen et al., 2004). Die immunologische Funktion der NK-Zellen während der mCMV-Infektion wird auch über die Sekretion von IFN $\gamma$  ausgeübt. Die Rolle von IFN $\gamma$  im CMV-Infektionsmodell wird durch Versuche mit IFN $\gamma$ -defizienten Mäusen

(IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>) verdeutlicht. Diese zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit mCMV (Pomeroy et al., 1998). Obwohl der zuvor beschriebene genetische Unterschied zwischen C57BL/6 und BALB/c Mäusen auch in der IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mauslinie weiter zu beobachten ist, sind C57BL/6 IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse weniger anfällig als die BALB/c IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäuse. Dennoch lässt sich aus den Experimenten schließen, dass IFN $\gamma$  eine signifikante Rolle in der Immunabwehr von mCMV spielt (Pomeroy et al., 1998).

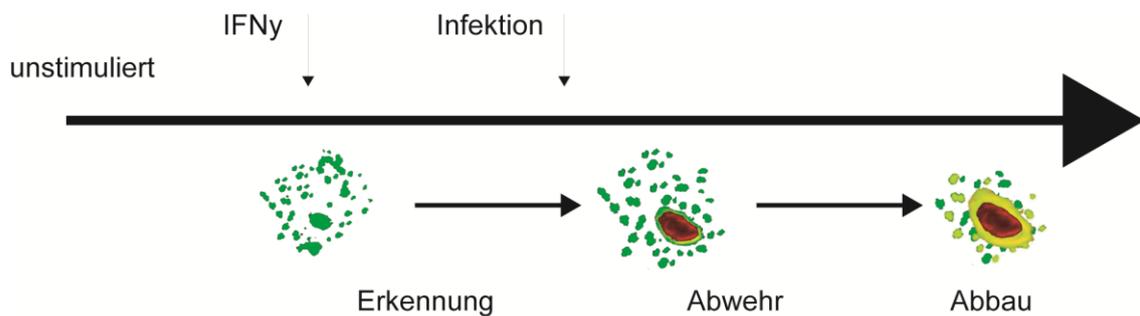
Im weiteren Verlauf der Infektion wächst die Bedeutung der adaptiven Immunantwort. Hier sind in erster Linie CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen von Bedeutung (Reddehase et al., 1988; Reddehase et al., 1985). Diese erkennen virale Proteine, die mittels MHC I-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden und dadurch aktiviert werden. Aktivierte CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen lösen daraufhin die Apoptose der infizierten Zelle aus (Reddehase et al., 1988; Reddehase et al., 1985). Des Weiteren können CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Präsentation von viralen Peptiden in MHC II-Komplexen auf Makrophagen, Dendritischen Zellen oder B-Zellen aktiviert werden und den Verlauf der Virusinfektion beeinflussen (Selgrade und Osborn, 1974). Ebenfalls essentiell während der Bekämpfung einer mCMV-Infektion sind IFN $\alpha/\beta$  und TNF $\alpha$ . Sie limitieren die Virusreplikation während der frühen Infektionsphase. IFN $\alpha/\beta$  wird von einer Subpopulation der Dendritischen Zellen (DCs) produziert und ist wichtig für die Aktivierung der NK-Zellen und der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (Dalod et al., 2003). Im weiteren Verlauf der Infektion inhibieren IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  die Virusverbreitung, indem sie die Präsentation von viralen Peptiden durch MHC I-Moleküle für CD8<sup>+</sup> T-Zellen fördern (Hengel et al., 1994).

Im Gegenzug zum selektiven Druck des Wirtsimmunsystems hat CMV verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Wirtsimmunantwort zu entgehen. Aufgrund ihres relativ langen Replikationszyklus zögern die Viren die Apoptose der Wirtszelle hinaus. Dies geschieht durch die direkte Apoptosehemmung durch viraler Proteine oder indem sie das Auslösen der Apoptose durch die Zellen des Immunsystems verhindern (Skaletskaya et al., 2001; Zhu et al., 1995). Zum Beispiel wird die Präsentation von Peptiden mittels der MHC I-Moleküle inhibiert, wodurch die CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellaktivierung verhindert werden soll (Alcami und Koszinowski, 2000; Ploegh, 1998). Außerdem wird nach mCMV-Infektion ein MHC-I-Homolog exprimiert, welches inhibierend auf NK-Zellen wirkt (Farrell et al., 2000; Farrell et al., 1999; Reyburn et al., 1997).

## 1.5 Zielsetzung

Vorhergehende Studien zeigten, dass die Expression verschiedener GTPasen nach IFN $\gamma$ -Stimulation induziert wird (Boehm et al., 1998). Unter ihnen sind auch die in dieser Arbeit im Fokus stehenden GBPs (Boehm et al., 1998; Degrandi et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels Kolokalisationsstudien sowie durch Untersuchung verschiedener zellulärer Signalwege die Funktionalität und der Mechanismus der Rekrutierung der GBPs an die parasitophore Vakuole (PV) von *T. gondii* aufgeklärt werden.



**Abbildung 4:** Zeitliche Abfolge einer *T. gondii* Infektion. Zunächst die induzierte Expression der mGBPs (grün) und die Rekrutierung an die PV nach Infektion mit *T. gondii*. Durch IFN $\gamma$ -induzierte Effektormechanismen wird die PV angegriffen und der Parasit beseitigt, welche Rolle hier die mGBPs übernehmen ist noch nicht geklärt und von großem Interesse.

Die Vorgehensweise in der Arbeit entsprach dem zeitlichem Ablauf einer Infektion wie in Abbildung 4 dargestellt. Dabei war die Aufklärung der Lokalisation im IFN $\gamma$ -induzierten Zustand von Interesse. Die Vesikelstruktur sollte näher charakterisiert und mit anderen vesikulären Strukturen, wie zum Beispiel *lipid bodies*, in der Zelle verglichen werden. Im Verlauf der Infektion erkennen die mGBPs den eingedrungenen Parasiten und rekrutieren an die PV. Die zellulären und molekularen Mechanismen für diese Rekrutierung konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Es bleibt fraglich, ob die Rekrutierung der mGBPs von einem sensorischem Signal und einer darauffolgenden Aktivierung abhängig ist, oder ob die mGBPs selbst Veränderungen durch die *T. gondii* Invasion wahrnehmen und es zu einer autokatalytischen Aktivierung und Rekrutierung an die PV kommt. Die Dynamik und die Mobilität von mGBP2 bei der Rekrutierung sollte untersucht werden. Die Mechanismen der mGBP-Vesikeldynamik wurden bisher nicht beschrieben und sollten im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von *live cell imaging* Aufnahmen analysiert werden. Im Mittelpunkt des Interesses stand hier, inwieweit die Vesikel als Ganzes an die PV rekrutieren und ob diese Mobilität zytoskelettabhängig ist. Im weiteren zeitlichen Ablauf der Infektion kommt es zur Zerstörung der PV und letztendlich zur Inaktivierung des Parasiten. Hier ist eine Effektorfunktion der mGBPs denkbar und sollte durch mikroskopische Untersuchungen analysiert werden.

Außerdem sollte durch eine vergleichende Analyse zwischen mGBP6 und mGBP10 ein Motiv identifiziert werden, welches für die Rekrutierung der mGBPs zur parasitophoren Vakuole entscheidend ist. mGBP6 und mGBP10 zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit und verhalten sich nach *T. gondii* Infektion dennoch verschieden: mGBP6 akkumuliert um die PV, mGBP10 verbleibt in der ursprünglichen zytoplasmatischen Verteilung.

Des Weiteren sollte die Rolle von mGBP2 während der Infektion *in vivo* mit MCMV aufgeklärt werden.

## 2 Material

### 2.1 Bezugsquellennachweise

#### 2.1.1 Inhibitoren

Bezeichnung	Bezugsquelle
BAPTA-AM	Calbiochem
4-BPB	Sigma Aldrich, Taufkirchen
3-Methyladenine	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Vinblastine	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Cytochalasin-D	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Wortmannin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Nocodazole	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Paclitaxel	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tubulozol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
U126	Cell Signaling Technology, Boston USA

#### 2.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Collagenase Typ VIII	Sigma Aldrich, Taufkirchen
SuperScript III	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DNA Polymerase, High Fidelity	Roche, Mannheim
DNA Polymerase, Native Pfu Turbo	Stratagene, Texas USA
DNA T4 Ligase	Roche, Mannheim
DNA Ligations Mix	TaKaRa, Shiga Japan
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Frankfurt a. M. Roche, Mannheim MBI Fermentas, St. Leon Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	USB, High Wycombe, UK

#### 2.1.3 Antikörper

Antikörper	Verwendung	Bezugsquelle
Anti- $\beta$ -Aktin	Western Blot	Sigma – Aldrich, Taufkirchen
Anti-GFP	Western Blot	Roche, Mannheim
Anti-LC3 A/B	Western Blot	Cell Signaling Technology, Boston USA

## Material

---

Anti-mGBP1.2	Western Blot Immunfluoreszenz	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP2	Western Blot Immunfluoreszenz	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP3.2	Western Blot	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP5.2	Western Blot	Eurogentec, Belgien
Anti-SQSTM1/p62	Western Blot Immunfluoreszenz	Abcam, Cambridge UK
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> Sag1	Immunfluoreszenz	Abcam, Cambridge UK
Cy <sub>TM</sub> 2 Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Immunfluoreszenz	Jackson ImmunoResearch, Suffolk UK
Cy <sub>TM</sub> 2 Goat Anti-Rabbit IgG	Immunfluoreszenz	Jackson ImmunoResearch, Suffolk UK
Cy <sub>TM</sub> 3 Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Immunfluoreszenz	Jackson ImmunoResearch, Suffolk UK
Cy <sub>TM</sub> 3 Goat Anti-Rabbit IgG	Immunfluoreszenz	Jackson ImmunoResearch, Suffolk UK
Cy <sub>TM</sub> 3 Goat Anti-Rat IgG + IgM	Immunfluoreszenz	Jackson ImmunoResearch, Suffolk UK
Goat Anti-Mouse HRP	Western Blot	Dianova, Hamburg
Goat Anti-Rabbit IgG HRP	Western Blot	BD Bioscience, Heidelberg
αB220	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
αCD3	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
αCD8α	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
αCD11b	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
αCD11c	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
αCD19	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
αF4/80	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
αGr1	FACS	BD Bioscience,

$\alpha$ NK 1.1	FACS	Heidelberg	
Streptavidin	FACS	BD Heidelberg	Bioscience,
Alexa Fluor 405 goat Anti-mouse IgG	Immunfluoreszenz	Invitrogen, Karlsruhe	
Alexa Fluor 405 goat Anti-rabbit IgG	Immunfluoreszenz	Invitrogen, Karlsruhe	
Alexa Fluor 633 goat Anti-mouse	Immunfluoreszenz	Invitrogen, Karlsruhe	
Alexa Fluor 633 goat Anti-rabbit	Immunfluoreszenz	Invitrogen, Karlsruhe	
Alexa Fluor 488 goat Anti-rabbit	Immunfluoreszenz	Jackson ImmunoResearch, Suffolk UK	

## 2.1.4 Kits und Verbrauchsmaterial

Reagenz oder Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
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
Nitrocellulose Membran Protan BA85	Whatman, Dassel
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
PCR-Gelextraktionskit	Zymo Research Cooperation, Irving, USA
Plasmidisolierung Zyppy	Zymo Research Cooperation, Irving USA
Plasmid-Isolierungskit: Maxi-Prep	Macherey-Nagel, Düren
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	BD Falcon, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
qPCR MasterMix No ROX	Eurogentec, Liege, Belgien
Quik-Change II Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Californien
Quik-Change Multi Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Californien
Quik-Change XL Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Californien
Rotiphorese® Gel 30%	Roth, Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid	
Spritzen	Omnifix, Melsungen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning® Kit 2.1	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity	Roche, Mannheim

## 2.1.5 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Brutschrank (Heraeus Heracell 240)	Heraeus, Hanau
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg
Sterilbank, HLB 2472 GS	Heraeus, Hanau
Ein- und Multikanalpipetten	Thermo Fisher Scientific, Bonn
FACS Aria I	BD Bioscience, Heidelberg
IQ-5 Cycler	Bio-Rad, München
Multistep-Dispenser Handystep	Brand, Wertheim
Heizblock/ Thermoblock Thermomix kompakt	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer MR3001 K	Heidolph, Schwabach
Millipore Anlage	Millipore, Schwabach
NanoDropp 1000	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
pH-Meter MP225	Mettler-Toledo, Giessen
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax T25	IKA, Staufen
Vortex Schüttler VVR	VWR, Darmstadt
Waage Precisa 600c	Oehmen Labortechnik, Essen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Konfokales Fluoreszenzmikroskop, LSM 780	Zeiss, Jena
Abzug	WRT-Laborbau, Stadtlohn
Analysewaage Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Cell Density Meter Ultraspec 10	Amersham Bioscience,
Elektrophoresekammer für DNA	Hoefer, Amsterdam
Elektrophoresekammer für NuPAGE Gele: X sure Lock	Invitrogen, Karlsruhe
Geldokumentationssystem, BioDocAnalyse	Bio-Rad, München
PCR-Geräte, Thermocycler	Biometra Göttingen

Proteintransfer-Apparatur, Transblot SD	Bio-Rad, München
Schüttler für Bakterienkulturen, Ecotron	Infors HT, Schweiz
Spannungsquellen, Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifugen	
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Medien und Puffer

Collagenase VIII	100 mg/ml	in PBS
DNase I	3000 U/ml	in PBS
FACS-Puffer	1x	PBS
	2 % (v/v)	FCS
	2 mM	EDTA
Organ-Verdaupuffer	6 % (v/v)	Collagenase Typ VIII
	1 % (v/v)	DNase I Lösung
	93 % (v/v)	PBS
PBS, pH 7,4	13,7 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>
PFA-Fixierlösung	4 % (w/v)	Paraformaldehyd in PBS
FACS Stop Puffer	1x	PBS
	10 mM	EDTA
Permeabilisierungslösung	0,02 % (w/v)	Saponin in PBS
Blockierungslösung	2 % (v/v)	Ziegen Serum in 10 % Permeabilisierungslösung
5x DNA Auftragspuffer	15 % (v/v)	Ficoll Typ 400
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,05 % (w/v)	Xylencyanol
dNTP Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dGTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dCTP
HEBES 2x, pH 7,0	0,28 M	NaCl
	0,05 M	HEPES
	1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
TAE (Elektrophoresepuffer), pH 8,0	2 M	Tris/HCL
	1 M	Eisessig
	0,1 M	EDTA

## Material

---

TBS-T	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCL
	0,1 % (v/v)	Tween-20
WB Auftragspuffer pH 6,8	5x, 45 % (w/v)	Glycerin
	25 % (w/v)	$\beta$ – Mercaptoethanol
	10 % (w/v)	SDS
	0,15 %	Bromphenolblau
	30 mM	Tris/HCL
WB Lysepuffer	140 mM	NaCl
	20 mM	Tris HCL
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 % (v/v)	NP-40
	1x	Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche)
	1x	Phospho STOP (Roche)
WB Laufpuffer (20x), pH 8,3	50 mM	MOPS
	50 mM	Tris Base
	1 mM	EDTA
	0,1 % (w/v)	SDS
WB Transferpuffer	25 mM	Bicine
	25 mM	Bis/Tris
	1 mM	EDTA
	20 % (v/v)	Methanol
VSF (Virus Standard Puffer)	50 mM	Tris-Base, pH 7,8
	10 mM	KCl
	5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	15 % (w/v)	Sucrose

---

## 2.3 Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien wurden den verwendeten Zelllinien angepasst. Fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Verwendung für 20 min bei 56°C inkubiert um Komplementproteine zu inaktivieren.

Zellen	Konzentration	Bestandteile
murine embryonale Fibroblasten (MEF)		DMEM VLE
	10 % (v/v)	FCS
	2 mM	L-Glutamin

---

	1 % (v/v)	Penicillin/Ampicillin
humane Vorhautfibroblasten (HFF) / murine Fibrosarkom Zellen L929		IMDM
	10 % (v/v)	FCS
	2 mM	L-Glutamin
NIH 3T3 Fibroblasten		DMEM VLE
	10 % (v/v)	FCS
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Penicillin/Ampicillin
humane embryonale Nierenzellen (HEK) 293FT		DMEM VLE
	10 % (v/v)	FCS
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Penicillin/Ampicillin
	0,05 mM	B – ME
Einfriermedium	40 % (v/v)	Medium
	50 % (v/v)	FCS
	10 %	DMSO

## 2.4 Zusätze Zellkultur

β-Mercaptoethanol		Gibco, Karlsruhe
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)		Gibco Karlsruhe
Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline (PBS)		Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)		PAN Biotech, Aidenbach
Neugeborenes Kälberserum (NKS)		Biochrom, Berlin
Hank's Buffered Saline Solution (HBSS)		Gibco, Karlsruhe
L-Glutamin		Gibco, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)	Gibco, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Puromycin (10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O,)	

## 2.5 Medien für die Bakterienkultur

### Medium Zusammensetzung

LB Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1 l
pH	7,2

Das Medium wurde durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiert. Das Festmedium entsteht durch Zugabe von 12 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren. Die Anzucht der Bakterien erfolgte aerob bei 37°C. Zur Langzeitkonservierung wurden über Nacht gewachsene Klone mit 50% sterilem Glycerin gemischt und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

## 2.6 Antibiotika

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert	100 µg/ml

## 2.7 Eukaryotische Zellen

Zellen	Eigenschaften	Referenz
HFF	humane Vorhautfibroblasten	ATCC, Wessel
L-929	Fibroblasten	Standford et al. 1948
NIH 3T3	murine, embryonale Fibroblastenzelllinie	ATCC
264.7 RAW	murine Monozyten/Makrophagenzelllinie	Raschke et al., 1978

293T Zellen	aus Balb/c Mäusen humane, primäre embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit humanen Adenovirus Typ 5 DNA	Graham et al. 1977
293FT Zellen	293T Zellen zusätzlich mit pCMVSPORT6TAG.neo transformiert	Invitrogen

## 2.8 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> Stamm DH5 $\alpha$	supE44, $\Delta$ lacU169, ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	ATCC, Wesel
<i>Escherichia coli</i> TOP10	TOP10 F- mcrA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS- mcrBC), $\Delta$ 80lacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araD139, $\Delta$ (ara- leu)7697, galU, galK, rpsL, (StrR), endA1, nupG	Invitrogen (Karlsruhe)

## 2.9 Virenstämme

	Bezeichnung	Referenz
MCMV	MCMV $\Delta$ m157:luc	Trilling et al., 2011

## 2.10 Parasitenstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm ME49	ATCC, Wesel
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm BK	ATCC, Wesel

## 2.11 Primer

Die in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

### 2.11.1 Primer für das mGBP10-6 Fusionskonstrukt

Bezeichnung	Sequenz
mGBP6 rev 1	5'-CTTGTCCATGTAAAGCTTGTGTCC-3'
mGPP10 fwd2	5'-GGACACAAGCTTTACATGGACAAG-3'

### 2.11.2 Primer für die mGBP6 Mutationen

Bezeichnung	Sequenz
	5'-
mGBP6_E590D_for	AAAAGAAACACTGATCGAATTAAGGATGCTCTCTTAAATGGATTTTC-3'
	5'-GAAAATCCATTTAAGAGAGCATCCTTAATTTCGATCAGTGTTCCTTTT-
mGBP6_E590D_rev	3'
mGBP6 E499D for	5'-GCAGAGAAGGAGCAAGATCTGCTAAGACAGAAGCA-3'
mGBP6 E499D rev	5'-TGCTTCTGTCTTAGCAGATCTTGCTCCTTCTCTGC-3'
mGBP6 L523I for	5'-AGAAAAGTCACAAGGAAAACATAGAGCAACTGAGAAGGAAG-3'
mGBP6 L523I rev	5'-CTTCCTTCTCAGTTGCTCTATGTTTCCTTGTGACTTTTCT-3'
	5'-CTGGAGCAGGAGAGAGAGCAGCTAATCAAAGACCATGATATGATG-
mGBP6 D537L for	3'
mGBP6 D537L rev	5'-CATCATATCATGGTCTTTGATTAGCTGCTCTCTCTCCTGCTCCAG-3'
mGBP6 D542N for	5'-GCAGGACATCAAAGACCATAATATGATGCTGAAGAAGCT-3'
mGBP6 D542N rev	5'-AGCTTCTTCAGCATCATATTATGGTCTTTGATGTCCTGC-3'
mGBP6 M549L for	5'-CATGATATGATGCTGAAGAAGCTATTGAAGGATCAAAGGCTTTTC-3'
mGBP6 M549L rev	5'-GAAAGCCTTTTGATCCTTCAATAGCTTCTTCAGCATCATATCATG-3'
mGBP6 E481K for	5'-CCCTCACTGCTGGGAAGAAGGCCATTGCA-3'
mGBP6 E481 K rev	5'-TGCAATGGCCTTCTTCCCAGCAGTGAGGG-3'
mGBP6 E499D for	5'-CAGAGAAGGAGCAGGATCTGCTAAGACAGAAGC-3'
mGBP6 E499D rev	5'-GCTTCTGTCTTAGCAGATCCTGCTCCTTCTCTG-3'
mGBP6 R517K for	5'-GTATATGGAGGCTCAAGAGAAAAGTCACAAGGAAAACATAG-3'
mGBP6 R517K rev	5'-CTATGTTTTCTTGTGACTTTTCTCTTGAGCCTCCATATAC-3'
mGBP6 E531M for	5'-AACTGAGAAGGAAGCTGATGCAGGAGAGAGAGCAGG-3'
mGBP6 E531M rev	5'-CCTGCTCTCTCCTGCATCAGCTTCTTCTCAGTT-3'
	5'-
	CATGATATGATGCTGAAGAAGCAATTGAAGGATCAAAGGCTTTTCCT-
mGBP6 L548Q for	3'
	5'-
mGBP6 L548Q rev	AGGAAAGCCTTTTGATCCTTCAATTGCTTCTTCAGCATCATATCATG-3'

### 2.11.3 Primer für die mGBP10 Mutationen

Bezeichnung	Sequenz
mGBP10 N542D for	5'-AGAGAGCAGCTCATCAAAGACCATGACATGATGCTGAAG-3'
mGBP10 N542D rev	5'-CTTCAGCATCATGTCATGGTCTTTGATGAGCTGCTCTCT-3'
mGBP10 Q548L for	5'-ATAACATGATGCTGAAGAAGCTGATGAAGGATCAAAGGCTTTCC-3'
mGBP10 Q548L rev	5'-GGAAAGCCTTTTGATCCTTCATCAGCTTCTTCAGCATCATGTTAT-3'
mGBP10 L549M for	5'-CATGATGCTGAAGAAGCAGATGAAGGATCAAAGGCTTT-3'

mGBP10 rev	L549M	5'-AAAGCCTTTTGATCCTTCATCTGCTTCTTCAGCATCATG-3'
mGBP10 for	D590E	5'-AAAAGAAACACTGATCGAATTAAGGAGGCTCTCTTAAATGGATTTTC-3'
mGBP10 rev	D590E	5'-GAAAATCCATTTAAGAGAGCCTCCTTAATTCGATCAGTGTTTCTTTT-3'

### 2.11.4 Primer für die mGBP2 Mutationen

Bezeichnung	Sequenz
mGBP2_y522F_for	5'- CAGCAGAAGGAAAAGAGTTTCCAGGAGCATGTGA-3'
mGBP2_y522F_rev	5'-TCACATGCTCCTGGAAACTCTTTTCCTTCTGCTG-3'
mGBP2_Y445F_for	5'-GACAAGAGCTAGAGAAAAAGTTTAACCAGGCTCCTGG-3'
mGBP2_Y445F_rev	5'-CCAGGAGCCTGGTTAAACTTTTTCTCTAGCTCTTGTC-3'
mGBP2_E543Q_for	5'- CGAACAGAAACAGTTATTAGCACAGCAGGAAAACATCATAGCTGCTA-3'
mGBP2_E543Q_rev	5'- TAGCAGCTATGATGTTTTCTGCTGTGCTAATAACTGTTTCTGTTTCG-3'

### 2.11.5 Primer für die mGBP6-pWPXL/mCherry Klonierung

Bezeichnung	Sequenz
mGBP6/pWPXL-Sma for	5'- AATTCCCGGGAACCCAACCACAAATGG-3'
mGBP6/pWPXL-NdeI rev	5'- AATTCATATGTCATAAATGCTTTAGATAACGGACAAGGTAATG-3'

### 2.11.6 Plasmidvektoren/Ausgangsvektoren

Bezeichnung	Eigenschaften	Bezugsquelle
pWPXL	Ausgangsvektor zur Klonierung der pWPXL-Konstrukte; EF1-Promotor, Amp <sup>R</sup>	Labor Trono(Pan et al.,2007)
pWPXL/mCherry	Ausgangsvektor zur Klonierung von pWPXL-mCherry-w/o-STOP, EF1--Promotor, Amp <sup>R</sup>	
pDsRed-Monomer-C1	Expressionsvektor für N-terminales DsRed-Fusionsprotein, CMV-Promotor, Kan <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	Clontech
pFRTZ-mCherry	Expressionsvektor für mCherry; HCMV-MIEP Promotor	Dr. Vu Thuy Khanh Le (Essen)
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_-Fragment	Invitrogen
pLP/VSVG	Expressionsvektor zur lentiviralen Transduktion (envelope),	Invitrogen

psPAX2	Expression des VSV-G Gens (VSV G Glycoprotein), CMVPromotor, Amp <sup>R</sup> Expressionsvektor zur lentiviralen Transduktion (Packaging), Expression von Gag, Pol und Env, CMV-Promotor, AmpR	Labor Trono
--------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------

### 2.11.7 im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide

	Ausgangsvektoren
mGBP6 Mutanten	dsRed
mGBP6 Mutanten	pWPXL/mCherry
mGBP10 Mutanten	pWPXL/GFP
mGBP2 Mutanten	pWPXL/GFP

### 2.11.8 Primer und Sonden für die RT-PCR

Gen	Primer1 (5'→3')	Primer 2 (5'→3')	Roche Sonde #
mGBP1	CAGACTCCTGGAAAGGGACTC	CTTGGATTCAAAGTATTTTCTCAGC	41
murines	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	CGCTCAGGAGGAGCAATG	106
β-Actin			
p62/SQSTM1	TGGGAGAGGGACTCAATCAG	GAAGCTGCCCTATACCCACA	110
IFN $\gamma$	ATCTGGAGGAACTGGCAA	TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG	27
IFN $\beta$	CATGCAACCTTTAAGCATCAG	CCTTTGACCTTTCAAATGCAG	95
IL-6	CCAGGTAGGTATGGTACTCCAGAA	GCTACCAAAGTGGATATAATCAGG	6

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung eukaryotischen Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in behandelten Zellkulturflaschen oder Mehrfach-Loch-Platten unter sterilen Bedingungen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert, indem sie mit PBS gewaschen und für 3 min mit Trypsin/EDTA bedeckt wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt und eine angemessene Zahl an Zellen neu ausgesät.

#### 3.1.2 Kultivierung von *T. gondii*

Zur Vermehrung der intermediär virulenten Typ II ME49 *Toxoplasma gondii*, wurden 1\*10<sup>6</sup> Parasiten in T25 Zellkulturflaschen auf ein Monolayer von HFF in IMDM-Medium

kultiviert. Die virulenten Typ I BK Parasiten wurden auf L929 Zellen kultiviert. Hierzu wurden  $1 \cdot 10^7$  Parasiten mit  $1 \cdot 10^6$  L929 Zellen in eine T25 Zellkulturflasche gegeben. Nach Vermehrung der Parasiten und Lyse der Wirtszellen wurde der Überstand abgenommen und bei  $50 \times g$  (600rpm) und RT wurden Wirtszellrückstände zentrifugiert. Durch eine weitere Zentrifugation des Überstandes bei  $600 \times g$  (1800 rpm) für 15 min bei RT wurden die Parasiten pelletiert. Diese wurden in IMDM Zellmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und entsprechende Mengen auf neue Wirtszellen gegeben.

### 3.1.3 Transfektion von Fibroblasten

#### 3.1.3.1 Stabile Transduktion mittels Virusüberstand

Um genetisches Material stabil in Zielzellen zu exprimieren, wurde der virale Gentransfer genutzt. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten lentiviralen Vektoren sind nicht replikationsfähig, sie durchlaufen den lentiviralen Replikationszyklus nur bis zur Integration der DNA in das Zielzellgenom und werden daher als sich selbst inaktivierend bezeichnet.

Für die Herstellung lentiviraler Überstände, wurden drei Plasmide transient in 293FT Zellen transifiziert. Dazu wurden am Vortag  $5 \cdot 10^6$  293FT Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale in DMEM-Medium ausgesät. Zur Transfektion wurden 20  $\mu\text{g}$  des Expressionsvektors mit dem zu exprimierenden Gen, 15  $\mu\text{g}$  des Verpackungsvektors psPAX2 und 5  $\mu\text{g}$  des Hüllproteinvektors pLP/VSVG gemischt und auf 250  $\mu\text{l}$  mit 2,5 mM HEPES aufgefüllt. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  0,5 M  $\text{CaCl}_2$  wurde die Lösung unter Vortexen zu 500  $\mu\text{l}$  2x HEBES-Lösung tropfenweise hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 35 minütige Inkubation bei RT, währenddessen sich ein feiner Niederschlag aus Kalziumphosphat und DNA bildete. Es erfolgte ein Mediumwechsel bei den 293 FT Zellen, wobei das Kulturmedium gegen FKS-freies Medium ausgetauscht wurde. Der Inkubation bei RT folgend wurde der Transfektionsansatz unter Schwenken auf die Zellen getropft und für 6 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Darauf erfolgte ein Mediumwechsel, das FKS-freie Medium mit dem DNA-Präzipitat wurde gegen Kulturmedium ausgetauscht. 48 h später wurde der Virusüberstand geerntet. Dazu wurde das Medium abgenommen und für 10 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Der virenhaltige Überstand wurde dann durch ein  $0,45 \mu\text{m}$  Zellsieb filtriert und in Kryotubes aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

Für die Transduktion der Zielzellen mit dem erzeugten lentiviralen Überstand wurden am Vortag  $3 \cdot 10^4$  MEFs oder NIH 3T3 Fibroblasten auf 24-Loch-Platten ausgesät. Am Tag der Transduktion wurde das Kulturmedium gegen 600  $\mu\text{l}$  des erzeugten Virusüberstandes und 25  $\mu\text{g}$  Polybrene ausgetauscht. Es erfolgte eine Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank für 30 min und anschließend eine Zentrifugation für 2 h bei 1.200 rpm und  $32^\circ\text{C}$ . Nach weiteren 4 h im Brutschrank wurde der Virusüberstand gegen Kulturmedium ausgetauscht. Die transduzierten Zellen wurden anschließend alle zwei

Tage passagiert und auf größere Zellkulturschalen gesetzt. Die Transduktion wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft und die positiven Zellen über einen durchflusszytometrischen Sortiervorgang angereichert (Dr. Daniel Degrandi).

### **3.1.3.2 Transiente Transfektion mittels JetPrime**

Die transiente Transfektion von Fibroblasten wurde mittels Jet PRIME (Polyplus) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen (3T3 NIH oder MEFs) am Vortag in 24-Loch-Platten auf Deckgläschen ausplattiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit IFN $\gamma$  (100 U/ml) stimuliert, am nächsten Tag mit *T. gondii* infiziert und für die Immunfluoreszenz eingesetzt (3.1.4 und 3.1.5).

### **3.1.4 In vitro Infektion mit *T. gondii***

Es wurden am Vortag  $3 \cdot 10^5$  Fibroblasten in 24-Loch-Platten auf Deckgläschen ausplattiert und 10 h später mit IFN $\gamma$  (100U/ml) über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit *T. gondii* im Verhältnis 1:50 für 2 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit PBS für 5 min gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Intrazelluläre Parasiten wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt (3.1.5).

### **3.1.5 Immunfluoreszenzfärbung (IF)**

Für die Lokalisationsstudien wurden Immunfluoreszenzfärbungen angewandt. Dazu wurden die Zellen ggf. mit *T. gondii* infiziert (3.1.4) und mit 4 % PFA für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin folgte die Permeabilisierung, wobei die Zellen in der Regel in 0,02% Saponin/PBS Lösung bei RT langsam geschwenkt wurde. Nur bei der selektiven Permeabilisierung (3.2) wurden abweichende Konzentrationen genutzt. Der Permeabilisierung folgte die Blockierung mit 2 % Ziegen Serum in 0,002 % Saponin/PBS für 20 min bei RT. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte 1:500 in 1:10 verdünntem Block-Puffer für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 10 min in PBS gewaschen und dann mit dem sekundär Antikörper (1:200) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschstschritte mit PBS für 5 min und bei RT. Abschließend erfolgte die Kernfärbung mittels DAPI, wobei die Zellen in PBS mit DAPI (1:2500) 3 min bei RT inkubiert wurden und anschließend für 5 min mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen wurden mit Fluoromount G auf Objektträger befestigt und über Nacht bei 4°C ausgehärtet.

### **3.1.6 In vitro Anwendung von Inhibitoren/Chelatoren**

Im Rahmen der Lokalisationsstudien wurden Zellen und Parasiten ggf. vor der Immunfluoreszenzfärbung mit verschiedenen Inhibitoren wie in Tabelle 1 aufgeführt, behandelt.

Tabelle 1: Anwendung verschiedener Inhibitoren *in vitro*

	Konzentration	Anwendung
Nocodazol	4 $\mu$ M	Fibroblasten wurden 10 h vor <i>T. gondii</i> Infektion mit dem Inhibitor inkubiert
Paclitaxel	4 $\mu$ M	Fibroblasten wurden 10 h vor <i>T. gondii</i> Infektion mit dem Inhibitor inkubiert
Tubulozol	4 $\mu$ M	Fibroblasten wurden 10 h vor <i>T. gondii</i> Infektion mit dem Inhibitor inkubiert
U0126	10 $\mu$ M	Fibroblasten wurden 2 h vor <i>T. gondii</i> Infektion mit dem Inhibitor inkubiert
Gö6976	1-5 $\mu$ M	Fibroblasten wurden 1 h vor <i>T. gondii</i> Infektion mit dem Inhibitor inkubiert
4-BPB	0,05-0,5 $\mu$ M	<i>T. gondii</i> wurden für 30 min mit dem Inhibitor prä-inkubiert, Rückstände wurden durch einen Waschschrift entfernt

### 3.2 Selektive Permeabilisierung

Um Topologien an intrazellulären Membranen aufzuklären, kann im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung eine selektive Permeabilisierung durchgeführt werden. Dabei werden unterschiedliche Konzentrationen des Permeabilisierungsreagenz (Saponin) eingesetzt, um Unterschiede in der Permeabilität verschiedener Membrankomplexe in der Zelle zu erreichen. In dieser Arbeit wurde 0,001 % Saponin eingesetzt, um eine Permeabilisierung der äußeren Zellmembran zu erreichen. Wurden 0,02 % oder 0,1 % Saponin eingesetzt, wurde auch die innere Membran der parasitophoren Vakuole von *T. gondii* permeabilisiert und Antigene in der PV für Antikörper zugänglich gemacht. Für den Versuch wurde das Standardprotokoll der IF (3.1.5) insofern abgeändert, dass mit 3 % BSA in PBS anstatt mit Ziegen Serum blockiert wurde. Des Weiteren wurden unterschiedliche Permeabilisierungslösungen (0,001 - 0,1 % Saponin in PBS + 1 % BSA) eingesetzt. Die Waschschriffe zwischen den Antikörperfärbungen erfolgten mit PBS ohne Saponin.

### 3.3 Kalzium Depletion

Um die Kalzium-Abhängigkeit der mGBP-Translokation zu testen, wurden die Zellen am Tag des Versuches unter Kalzium-depletierenden Bedingungen gehalten. Dazu wurden sie am Vortag wie für eine IF (3.1.5) ausgesät und über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert. Am Tag der Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen um Kalzium-haltiges Medium zu entfernen. Dann wurden sie für 45 min entweder in Kalzium-freiem oder Kontroll-Medium inkubiert. Während der Inkubation wurden die Parasiten geerntet (3.1.2) und einmal in Kalzium-freiem Medium oder Kontroll-Medium gewaschen. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit den Parasiten infiziert (3.1.4) und die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (3.1.5).

Kalzium-freies Medium	Kontroll-Medium
145 mM NaCl	140 mM NaCl
5 mM KCl	5 mM KCl
2 mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	2,5 mM CaCl <sub>2</sub>
10 mM Glukose	10 mM Glukose
0,25 mM EGTA	
10 mM NaOH-HEPES	10 mM NaOH-HEPES
pH 7,3	pH 7,3
15 µM BAPTA-AM	

## 3.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 3.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde durch die modifizierte alkalische Lyse-Methode von (Birnboim und Doly, 1979) für qualitative Analysen mit dem Zyppy Mini Kit der Firma Zymo Research (Irvine, USA) oder für quantitative Analysen mit dem NucleoBond Xtra Maxiprep Kit von Machery Nagel jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA wurde am NanoDrop bestimmt. Positive Klone wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzanalyse (Firma GATC) überprüft.

### 3.4.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die passenden Banden unter UV-Licht ( $\lambda=230$  nm) aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mittels Zymoclean<sup>TM</sup> Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Konzentration wurde mittels NanoDrop bestimmt.

### 3.4.3 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente, wie PCR-Produkte und Plasmide wurden nach Restriktion aufgetrennt mittels Agarosegelelektrophorese. Dazu wurde 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid (1 % (v/v) Lösung) versetzt (1 µl Ethidiumbromidlösung/100 ml Agaroselösung). Nach Polymerisation des Gels wurde es in der Gelkammer im TAE-Puffersystem mit den Proben geladen und durch ein Spannungsfeld (120 V) wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt.

### 3.4.4 Restriktionsanalyse

In dieser Arbeit wurde DNA mit Hilfe von Endonukleasen des Typs II an spezifischen Erkennungsstellen geschnitten. Beim Typ II sind Erkennungs- und Spaltstelle

identisch. Die Restriktion wurde nach Angaben des Herstellers, MBI Fermentas (St. Leon-Rot), NEB (Frankfurt a.M.) oder Roche (Mannheim) durchgeführt.

### 3.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Polymerasen können einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges verwenden. Dies wird bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet, um Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren. Die doppelsträngige DNA (dsDNA) wird durch Erhitzen denaturiert. Während die Probe wieder herunterkühlt werden, können spezifische Primer an die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Fragments hybridisieren. Die thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert den Komplementärstrang bei 72°C. Eine zyklische Wiederholung der Temperaturänderungen führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten Fragments.

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

Reaktionsansatz	Ca. 100 ng	DNA
	1 µl	Primer 1 (20pmol)
	1 µl	Primer 2 (20pmol)
	5 µl	10x Reaktionspuffer
	1 µl	dNTP Mix (10 mM)
	0,2 – 1 µl	Polymerase
ad	50 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

Durchführung des Reaktionszyklus:

DNA Denaturierung	95°C	5 min	
DNA Denaturierung	95°C	1 min	
Primerhybridisierung	55-68°C	30 sec	
Primerverlängerung	72°C	1 min/1 kb	des
		Produkts	
Lagerung	4°C		

### 3.4.6 Mutagenese-PCR

Zur Insertion einzelner oder multipler Mutationen in einen Ausgangsvektor wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis oder das QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurden spezielle Primer mit Hilfe des QuikChange Primer Designs tools auf der Herstellerhomepage entworfen und durch die Firma Metabion synthetisiert. Vorwärts- und Rückwärtsprimer müssen die gewünschte Mutation enthalten. Die Ansätze der Standard oder XL-Mutagenese PCR wurde entsprechend den Angaben des Herstellers vorbereitet und unter angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Ansätze für 1 h bei 37°C mit *DpnI* verdaut. Hierbei werden die methylierten, nicht mutierten Vektorvorlagen fragmentiert. Abschließend wurden 3 µl eines Ansatzes zur Transformation von *E. coli* verwendet (3.4.11).

### 3.4.7 Quantitative PCR (realtime PCR)

Basierend auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die quantitative Realtime (qRT)-PCR die Möglichkeit zur Quantifizierung des entstehenden PCR-Produkts mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während eines jeden Zyklus. Mit Menge des PCR-Produktes nimmt die Fluoreszenz proportional zu. Diese wird mittels einer fluoreszenzmarkierten Sonde in das System hineingebracht. Bei der Sonde liegen die Fluorophore zuvor gequenchet vor und werden erst durch Abbau während der Polymerisierung freigesetzt. Die relative Genexpression wurde unter Verwendung der Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001) berechnet.

Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

---

12,5 µl	Fast Start Mastermix (Invitrogen)
6,5 µl	H <sub>2</sub> O
0,3 µl	Primer 1
0,3 µl	Primer 2
0,5 µl	Sonde
5 µl	1:5 verdünnte cDNA

---

Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

---

1.	DNA Denaturierung	95 °C	7 min
2.	DNA Denaturierung	94 °C	20 sec
3.	Primerhybridisierung und -verlängerung	60 °C	1 min
4.	Lagerung bis zur Weiterverarbeitung	4 °C	unendlich

---

Die Schritte 2 bis 3 wurden zyklisch 40-mal wiederholt. Unmittelbar wurde nach jedem 3. Schritt die Fluoreszenz gemessen. Die unterschiedliche Zunahme der Fluoreszenz konnte in CT-Werten dargestellt werden und somit verschiedene cDNA-Proben und Gene im Vergleich zum Standard, dem sogenannten Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin, verglichen werden.

### 3.4.8 Ligation

Während der Ligation werden die mit Endonuklasen behandelten DNA-Fragmente mit Hilfe der T4-Ligase in die ebenfalls geschnittenen Vektoren inseriert. Die optimale Insertion wird durch ein Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 ermöglicht, ist jedoch stark von den jeweiligen Fragmentgrößen abhängig. Der Ligationsansatz

wurde nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) zusammengestellt und über Nacht bei 15°C oder bei 22°C für eine Stunde inkubiert.

Alternativ wurden PCR-Fragmente mittels TOPO TA Cloning®Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in den Vektor pCR II-TOPO nach Angaben des Herstellers inseriert.

### 3.4.9 Isolierung von mRNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe der Guanidiniumthiocyanat-Methode. Hierzu wurde das TRIzol Reagenz von Invitrogen eingesetzt, bei dem es sich um eine Weiterentwicklung der genannten Methode handelt. Die Vorgehensweise erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 3.4.10 cDNA-Synthese aus gesamtzellulärer RNA

Während der cDNA-Synthese wird mRNA aus Zellen enzymatisch in DNA umgeschrieben. Dies erfolgt mit Hilfe einer reversen Transkriptase. Die molekularen Verhältnisse der Transkripte werden nicht verändert, daher eignet sich die entstehende cDNA zur Expressionsquantifizierung mittels quantitativer Realtime PCR (qRT-PCR).

Für die reverse Transkription wurden 3 µg RNA eingesetzt. Folgender Ansatz wurde auf Eis pippetiert:

Ansatz:	3 µg RNA in 10 µl DEPC-H <sub>2</sub> O
+	1 µl Oligo-dT Primer 10 µM (Invitrogen)
Inkubation des Ansatzes für 2 Minuten bei 70°C und anschließend Abkühlung auf Eis	
+	1 µl RNase Out
+	4 µl 5x First-Strand Buffer (Invitrogen)
+	1 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)
+	1 µl dNTP Mix 10 mM
+	2 µl M-MLV RT (Invitrogen)
Inkubation für 1 h bei 37°C	
Inaktivierung für 5 min bei 95°C	
+	80 µl H <sub>2</sub> O

### 3.4.11 Transformation chemokompetenter Bakterien

Hergestellte Plasmide wurden in Bakterien transformiert, die zuvor durch die Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> kompetent gemacht worden sind, DNA durch einen kurzen Hitzeschock aufzunehmen. Hierfür wurden der Bakterienstamm DH5α verwendet. 100 µl der kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz bzw. 100 ng zirkuläre, doppelsträngige DNA zugegeben. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 20 min. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 1 min. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium

wurden die Zellen für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, um die Expression der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz zu ermöglichen. Aus diesem Ansatz wurden dann entweder 100 µl direkt (low-Ansatz) oder angereichert durch kurze Zentrifugation und resuspendieren des Bakterienpellets in 100 µl Medium (high-Ansatz) auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck ausgestrichen und bei 37°C über Nacht angezogen.

## 3.5 Proteinbiochemische Methoden

### 3.5.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Für diverse proteinbiochemische Analysen wurde ggf. ein Gesamtzellextrakt hergestellt. Dazu wurden  $1 \cdot 10^6$  bis  $1 \cdot 10^7$  Zellen trypsinisiert, in PBS gewaschen und in Zelllysepuffer aufgenommen (100 µl pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen). Viele lösliche Zellkernproteine sowie zytoplasmatische Proteine können mittels nicht-ionischem Detergenz, im Puffer NP-40 (Igepal, Sigma Aldrich) vom Rest der Zelle getrennt werden. Dies erfolgte durch eine Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dadurch trennt man Proteinlysate von den restlichen Zelltrümmern, welche sich im Pellet befinden. Der Proteingehalt wurde mittels BCA-Assay (3.5.2) bestimmt. Entsprechende Proteinmengen wurden in 5x Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C aufgeköcht, wodurch es zur Denaturierung der Proteine kam. Die Proteinlysate wurden in der SDS-PAGE (3.5.3) und im Western Blot (3.5.4) weiter analysiert.

### 3.5.2 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen über BCA

Die Proteinkonzentration von Zell- und Organlysaten wurde mittels BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit von Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Grundlage dieses Assays ist die Bichinolin-Reaktion. Hierbei reagiert Bichinolin (BCA) mit einwertigen Kupferionen zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe. Die Farbveränderung kann photometrisch bei 562 nm verfolgt werden und mittels BSA-Standardkurve (0 – 2 mg/ml) kann der Proteingehalt der Probe ermittelt werden.

### 3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (denaturierende, diskontinuierliche Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Douglas (Douglas et al., 1979) diente der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld. Durch das Kochen der Proben in SDS-haltigem Auftragspuffer und die Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT (Dithiothreitol) wurden die Proteine denaturiert. Im Verlauf dieser Arbeit wurden 4-12 % Bis-Tris-Gradientengele der Firma Invitrogen und selbstgegossene 10 % Tris-Gele verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120-170 V im entsprechenden Laufpuffer.

### 3.5.4 Western Blot

Zur spezifischen Detektion der Proteine durch Antikörper wurden diese mittels Western Blot auf eine Träger-Membran übertragen. Für die Western Blot-Analyse wurde eine Nitrozellulose-Membran (0,45 µm Porengröße, Whatman, Dassel) und das *semi-dry* Verfahren mit dem Semy-Dry Elektrobloetter der Firma Peqlab Biotechnologie (Erlangen) eingesetzt. Zunächst wurden Trägermembran und Whatman-Papier in NuPAGE Transferpuffer äquilibriert, anschließend übereinander geschichtet. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 2 h auf die Membran transferiert. Der Proteinübertrag wurde mittels Ponceau-S Färbung überprüft. Nach dem Blotten wurde die Membran für 1 h in TBS-T Puffer mit 5 % Milchpulver blockiert. Dadurch wurden unspezifische Nebenreaktionen der Antikörper mit der Membran verhindert. Die Zugabe des ersten Antikörpers erfolgte in TBS-T + 3 % Milchpulver über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T Puffer entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem HRP-(Horse raddish Peroxidase) gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h in TBS-T Puffer mit 3 % Milchpulver. Abschließend wurde die Membran dreimal in TBS-T Puffer gewaschen. Zur Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte die Entwicklung des Blots mittels Chemo-Lumineszenz (ECL, enhanced chemoluminescence) mit dem Super-Signal West Pico Chemoluminescent Substrat – Kit der Firma Thermo Scientific (2.1.4) nach Angaben des Herstellers. Die Lichtemission der ECL Reaktion wurde mit Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL) der Firma Amersham (Buckinghamshire, UK) detektiert, die Filme in der Entwicklermaschine entwickelt und anschließend im Vergleich mit dem Größenstandard ausgewertet. Um weitere Proteine zu detektieren, z. B. anti-β Aktin zur Ladekontrolle, wurden gebundene Antikörper von der Membran abgelöst (gestrippt). Hierzu wurde die Membran 10 min in Re-Blot Plus Strong der Firma Millipore (Schwalbach) inkubiert, anschließend zweimal in TBS-T mit 5 % Milchpulver blockiert und es erfolgte eine wiederholte Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper wie beschrieben.

## 3.6 Tierversuche

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß des Tierschutzgesetzes § 8 und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt.

### 3.6.1 Versuchstiere

Die verwendeten Mäuse wurden im spezifisch-pathogenfreien (SPF-) Bereich der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gehalten und gezüchtet. Die mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse waren zum Zeitpunkt der Arbeitsaufnahme mindestens über 10 Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt (Degrandi et al., 2013).

## **3.6.2 Methoden der MCMV Infektion**

### **3.6.2.1 Herstellung Virusstock**

Um einen Virusstock herzustellen, wird zunächst ein Vorstock angelegt, in dem MEFs auf 6-er Schalen mit einer MOI von 0,6 für 48 h infiziert werden. Für den eigentlichen Virusstock werden in 25 - 30 T175 Flaschen MEFs ausgesät. Sind diese ca. zu 90 % konfluent, wird der Überstand vom Vorstock mit 500 ml DMEM (+ 1 % Pen/Strep, + 10 % FCS) vermischt und auf die Flaschen verteilt. Die Zellen werden für 4-5 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert und ggf. bei Verfärbung des Mediums (pH Umschlag) 5 ml frisches Medium hinzugegeben. Ein kompletter Mediumwechsel ist 1 - 2 Tage nach Infektion möglich.

Die Präparation des Virusstocks erfolgte, indem die Zellen von der Flasche gelöst wurden und der Überstand mit Zellen zentrifugiert wurde (10°C, 10 - 20 min, Beckman J2-21 Rotor 10000 rpm). Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde in neue Zentrifugenbecher überführt und abermals zentrifugiert, um das Virus zu pelletieren (4°C, 3 h, 13000rpm). Nun wurde der Überstand verworfen, sodass das Pellet noch leicht bedeckt war. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht oder 3 - 4 h auf Eis. Das Pellet wurde nun im verbleibenden Überstand resuspendiert und in einen Douncer überführt. Zum Zellaufschluss wurde die Suspension 20mal auf Eis gedounced. Jetzt wurde ein Sucrosekissen in Polyallomer Röhrchen vorgelegt (15 - 20 ml VSB/15 % Sucrose), darauf die Zellsuspension pipettiert. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 1,5 h bei 4°C und 20000 rpm. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Viruspellet mit 0,5 - 4 ml VSB/15 % Sucrose überschichtet. Abschließend folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht oder für 3 - 4 h auf Eis und dann die Resuspension des Pellets im Puffer. Der Virusstock wurde aliquotiert (10 – 30 µl) und bei -80°C gelagert.

Der Virustiter des Stocks wurde mittels Plaquestest bestimmt. Dazu wurden MEFs in 24well-Platten ausgesät und mit Virus aus zwei Vorverdünnungen (1:10 und 1:100) in Form einer Verdünnungsreihe ( $10^0$  -  $10^7$ ) infiziert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min, bei RT und 2000 rpm, danach wurde die Platte um 180° gedreht und die Zentrifugation erneut gestartet. Nach 2 h bei 37°C im Inkubator wurde das Medium gegen Methylcellulose ausgetauscht. Die Zellen wurden 4 - 7 Tage bebrütet und abschließen die Plaques ausgezählt

### **3.6.2.2 Infektion mit MCMV**

Für die Infektion mit MCMV wurden die Mäuse intraperitoneal mit  $4 \cdot 10^6$  PFU des MCMV Stammes Dm157-Luc rep (freundlicherweise von Katrin Ehrhardt und Albert Zimmerman zur Verfügung gestellt) infiziert. Als Kontrolltiere dienten WT Tiere und nicht infizierte Tiere. Zu verschiedenen Zeitpunkten (48 h, 72 h, 96 h, 14 d und 21 d) nach Infektion wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und Leber, Lunge, Milz und Speicheldrüsen präpariert.

### **3.6.2.3 Präparation von Organen**

Die Mäuse wurden nach zervikaler Dislokation fixiert, um die Organe zu entnehmen. Die isolierten Organe zunächst in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, bis der Luciferase-Assay durchgeführt werden konnte.

Für den Luciferase-Assay wurden die Organe gewogen und mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein  $70\ \mu\text{m}$  Zellsieb, angefeuchtet mit  $500\ \mu\text{l}$  PBS + 5 % FCS, gedrückt. Das Sieb wurde mit insgesamt  $2\ \text{ml}$  PBS + 5 % FCS gespült. Es folgte der erste Zentrifugationsschritt bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $800\ \text{rpm}$  für  $10\ \text{min}$ . Der Überstand wurde in ein neues  $15\ \text{ml}$  Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $4000\ \text{rpm}$ ,  $2\ \text{min}$ ). Der so erhaltene virushaltige Überstand wurde für die Infektion von BIM (BalbC immortal Fibroblasts, Mirko Trilling) verwendet und somit für den Luciferase Assay eingesetzt.

### **3.6.2.4 Bestimmung der Viruslast in den Organen mittels Luciferase Assay**

Von dem virushaltigen Überstand aus den Organen infizierter Mäuse (3.6.2.3) wurden für die Infektion der BIM Zellen  $200\ \mu\text{l}$  auf die Fibroblasten gegeben. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte, bei RT und  $2000\ \text{rpm}$  für  $15\ \text{min}$ , wobei zwischendurch die Orientierung der Platten um  $180^{\circ}$  geändert wurde. Nach zwei Stunden wurde das Medium gewechselt und nach  $24\ \text{h}$  wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit  $100\ \mu\text{l}$  Luciferase Lysispuffer (Roche, Mannheim) bedeckt. Nun wurden die Zellen samt Lysepuffer für  $24\ \text{h}$  bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, bis das Zelllysate für den Luciferase-Assay nach Anleitung des Herstellers eingesetzt werden konnte.

## **3.6.3 Methoden der *Toxoplasma* Infektion**

### **3.6.3.1 Präparation von *T. gondii*-Zysten**

Für die Infektion von Mäusen mit *T. gondii* -Zysten wurden latent infizierte BALB/c Mäuse im Zeitraum von 3 - 4 Wochen nach Infektion getötet und das Gehirn präpariert. Das isolierte Gehirn wurde mehrfach mit PBS gespült und mit einer Schere in einer  $5\ \text{cm}$  Petrischale in  $5\ \text{ml}$  PBS grob zerkleinert. Anschließend wurde das Organlysat durch sukzessiv kleiner werdende Kanülen ( $18$ ,  $20$ ,  $22\ \text{Gauge}$ ) gezogen und dadurch homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation ( $800\ \text{x g}$ ,  $5\ \text{min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und die Resuspension in  $15\ \text{ml}$  PBS. Das Organlysat wurde mit  $10\ \text{ml}$  Ficoll unterschichtet und für  $25\ \text{min}$  bei  $1000\ \text{x g}$  und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die Zysten im Pellet wurden in PBS resuspendiert und unter dem Mikroskop gezählt. Pro Maus wurden  $20$  Zysten intraperitoneal injiziert. Dazu wurden die Zysten lysiert, um die Bradyzoiten freizusetzen. Es wurde die gewünschte Zahl an Zysten in einem Gesamtvolumen von  $0,5\ \text{ml}$  PBS resuspendiert und mit  $150\ \mu\text{l}$  Trypsin/EDTA Lösung versetzt. Die Lyse der Zysten wurde unter dem Mikroskop verfolgt und passend durch die Zugabe von  $0,5\ \text{ml}$  FCS abgestoppt. Die lysierten Zysten wurden abschließend noch einmal bei  $1000\ \text{x g}$  ( $1800\ \text{rpm}$ ) und  $15\ \text{min}$  pelletiert und das Volumen so eingestellt, dass die gewünschte Zystenanzahl in  $200\ \mu\text{l}$  Injektionsvolumen gelöst war.

### 3.6.3.2 Präparation von Milz, Leber und Lunge für die FACS-Analyse

Die Mäuse wurden nach zervikaler Dislokation fixiert, die isolierten Organe wurden in 5 cm Petrischalen in 2 - 3 ml Organverdaupuffer überführt und mit Hilfe zweier Pinzetten zerrissen. Anschließend wurde die Suspension für 25 - 30 min bei 37°C inkubiert. Die verdauten Organe wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Reaktion wurde mit ca. 10 ml Stoppuffer beendet und über ein 70 - 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 min bei 4°C pelletiert. Bei der Milz wurden Erythrozyten lysiert, in 10 ml FACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Für die Anreicherung von Lymphozyten und Monozyten aus Leber und Lunge wurde das Zellhomogenisat über einen Percollgradienten aufgereinigt. Hierbei wurde das Zellpellet in 5 ml 40 % Percoll resuspendiert und mit 6 ml 70 % Percoll unterschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm und RT für 20 min. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und nur die mittlere Schicht (Mischpopulation mit B-, T-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen) wurde für die FACS-Analyse weiter verwendet. Dazu wurden die Zellen pelletiert (1200 rpm, 4°C, 5 min), in 1ml FACS Puffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

## 3.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Expression von spezifischen Markermolekülen auf Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) gemessen. Hierbei wurden verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenproteine mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Im Durchflusszytometer wird mittels Laserstrahl die Emission der fluoreszierenden Signale angeregt und das emittierte Streulicht von Detektoren registriert. Das durch Beugung hervorgerufene Vorwärtsstreulicht (*forward Scatter*) stellt ein Maß für die Zellgröße dar und das durch Brechung hervorgerufene Seitwärtsstreulicht (*side Scatter*) steht für die Granularität der Zelle. Die Detektoren, Photomultiplier (PMT) detektieren Vorwärts-, Seitwärtsstreulicht sowie die Fluoreszenzemission der an die Zellen gebundenen Antikörper.

Für die FACS-Analysen wurden in dieser Arbeit Zellsuspensionen verschiedener Organe (Milz, Leber, Lunge, Speicheldrüsen) verwendet. Alle Antikörper wurden im Überschuss eingesetzt. Die Inkubationsschritte erfolgten im Dunkeln bei 4°C. Die Zellsuspensionen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in FACS-Röhrchen durch ein Siebgewebe pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 5 min, 4°C) wurden zunächst die Fc-Rezeptoren CD16/32 für 10 min bei 4°C blockiert (1:50 in 24 µl FACS-Puffer). Anschließend wurden die fluorochromkonjugierten oder biotinylierten Antikörper in 25 µl FACS-Puffer hinzugegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff, wobei die Proben mit 2 - 3 ml FACS-Puffer verdünnt und dann pelletiert (1200 rpm, 5 min, 4°C) wurden. Bei Verwendung von biotinylierten Antikörpern wurden

die Proben mit 50 µl Sekundärreagenz, einem fluorochromkonjugierten Streptavidin, für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, anschließend erneut gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C). Abschließend wurden die Zellen in 200 - 500 µl FACS-Puffer + DAPI resuspendiert und analysiert. Die FACS-Analyse wurde mit dem FACS Canto II und der FACS Diva Software (BD Biosciences ) durchgeführt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Funktionelle Charakterisierung der Lokalisation von mGBP Proteinen in der Zelle

#### 4.1.1 Lipid Bodies

Die Stimulation mit IFN $\gamma$  führt zu einer induzierten Expression von Guanylat-Bindenden Proteinen (GBPs). Diese zeigen eine vesikuläre Verteilung im Zytoplasma. Ziel war es, die Art der vesikulären Strukturen zu bestimmen. Vorherige Arbeiten unserer und anderer Gruppen zeigten keine Kolo­kalisierung von mGBPs mit verschiedenen Zellorganellmarkern des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgi Apparates, der Endosomen oder von Membrankomplexen (Degrandi et al., 2007; Vestal et al., 2000).

Es konnte beobachtet werden, dass während der Infektion mit *T. gondii* eine Anreicherung sogenannter *Lipid Bodies* (Lipid Körperchen) erfolgt (Charron und Sibley, 2002). In der Vergangenheit wurde diesen Zellorganellen lediglich die Funktion als Lipidvorrat zugesprochen. In den letzten Jahren wurde entdeckt, dass es sich um dynamische und funktionell aktive Organellen handelt, die eine breite Funktion während des Lipidmetabolismus, bei Transportprozessen und in der Signal-Übertragung erfüllen (Farese und Walther, 2009).

Die steigende Bedeutung der Lipid-Vesikel in immunologischen Prozessen, ihre charakteristische vesikuläre Form sowie ihre Anreicherung nach *T. gondii* Infektion ließen vermuten, dass dies womöglich die GBP-enthaltenen Vesikel sind. Eine mögliche Kolo­kalisierung wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Dazu wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) über Nacht mit 100 U IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für 2 h mit *T. gondii* infiziert. Durch die Verwendung des lipophilen Farbstoffes BODIPY 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene; Molecular Probes), der sich spezifisch in die Membran einlagert, wurden die Lipid Bodies angefärbt (Abbildung 5). Des Weiteren wurde im Versuch mGBP1 mit einem Antikörper als Vertreter der mGBPs angefärbt, sowie das *T. gondii* Oberflächenprotein SAG1 als Parasitenmarker.

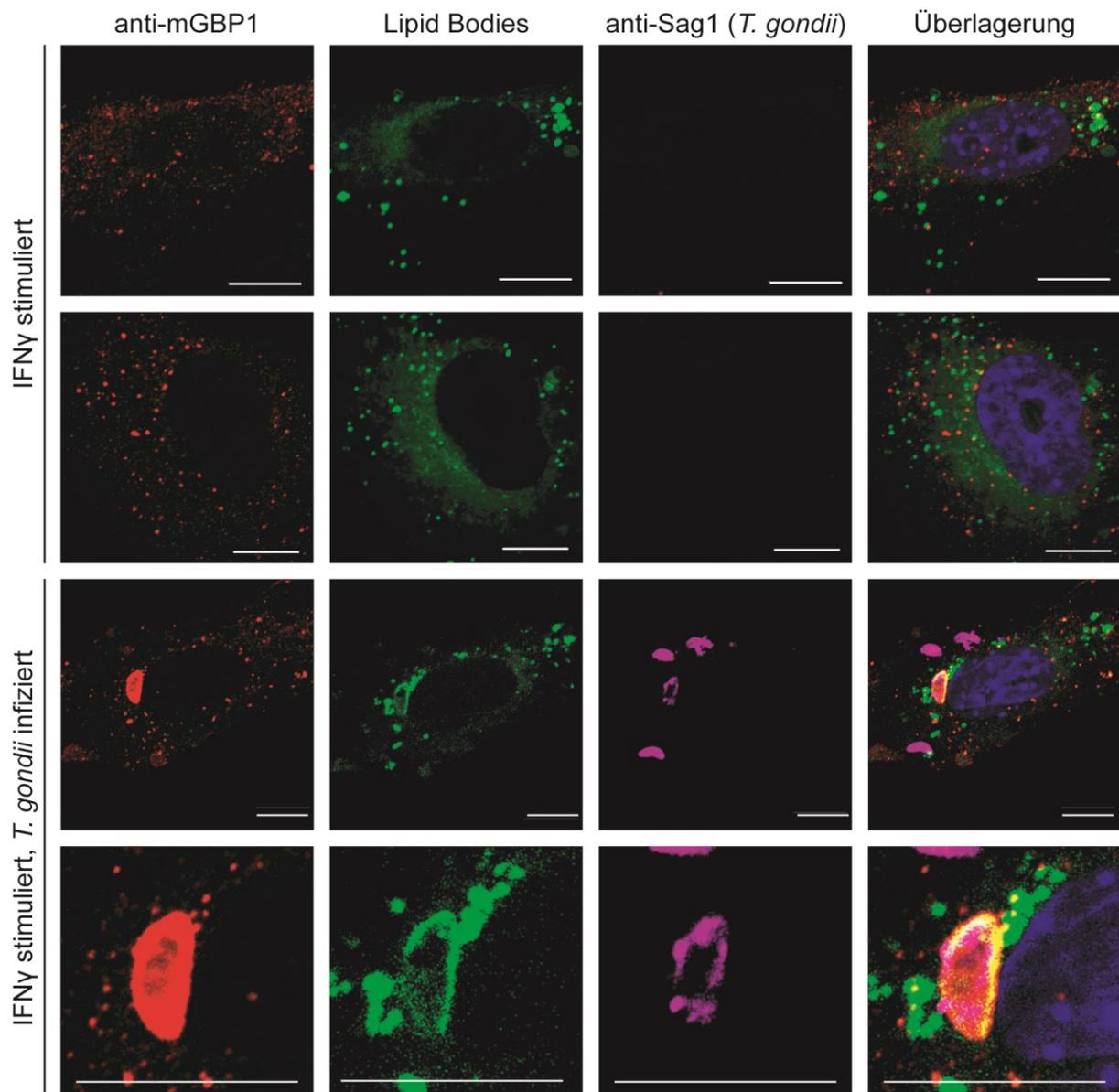


Abbildung 5: Kolokalisationsstudien zwischen Lipid Bodies und mGBP1-positiven Vesikeln; mGBP1 wurde mittels Antikörper gefärbt (rot), die Lipid Bodies mittels BODIPY 493/503 markiert (grün), *T. gondii* wurde mittels eines anti-Sag1 Antikörpers gefärbt (magenta), die letzte Spalte zeigt die Überlagerung. Die letzte Zeile zeigt eine Vergrößerung des intrazellulären Parasiten aus Zeile 3. Die Maßstabbalken zeigen eine Einheit von 10  $\mu$ m.

Trotz ähnlicher vesikulärer Verteilung konnte keine Kolokalisation mit GBP1-positiven Vesikeln beobachtet werden. Nach Infektion mit *T. gondii* kommt es zu einer Rekrutierung der Lipid-Vesikel zur parasitophoren Vakuole, hier dienen sie unter anderem als Lipidquelle für den Parasiten und werden in die PVM integriert. Daher zeigt sich an der PVM auch eine partielle Kolokalisation zwischen GBP-positiven Vesikeln und den Lipidorganellen. Es bleibt zu analysieren, ob diese Kolokalisation auch einen funktionellen Aspekt hat oder lediglich aufgrund der räumlichen Nähe zustande kommt.

### 4.1.2 Interaktion mit dem Adapterprotein p62/SQSTM1

Ein weiteres, durch IFN $\gamma$  induziertes, Effektormolekül ist das Adaptorprotein p62/SQSTM1 (p62) (Kim und Ozato, 2009). Das Protein ist an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Besonders während der Regulation zellulärer Abbaumechanismen ist es wichtig, indem es ubiquitinylierte Proteine sowie LC3 bindet und somit zum Abbau markierte Proteine oder Zellorganellen in den Prozess der Autophagie einschleust. Des Weiteren beeinflusst es andere Signalwege innerhalb der Zelle, unter anderem wird die Expression vieler proinflammatorischer Zytokine in aktivierten Makrophagen durch p62/SQSTM1 reguliert (Duran et al., 2008; Hurley et al., 2006; Kim und Ozato, 2009). Trotz vieler neuer Erkenntnisse ist bisher nur wenig über die Rolle von p62/SQSTM1 in der angeborenen Immunität bekannt. Durch die IFN $\gamma$ -abhängige Expression und die mögliche Rolle während früher, immunologisch wichtiger Prozesse, ist eine Interaktion mit GBPs denkbar. Daher wurden Kolokalisationsstudien mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie von p62/SQSTM1 und mGBP2 durchgeführt (Abbildung 6).

Hierzu wurden MEFs aus mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet, welche stabil mit einem GFP-mGBP2 Konstrukt transduziert wurden, welches unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven heterologen Promotors steht. Diese Zellen wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  (100 U) stimuliert und am nächsten Tag für 2 h mit *T. gondii* infiziert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte und nicht infizierte Zellen. Im Versuchsansatz wurde p62/SQSTM1 mit einem spezifischen Antikörper gefärbt. Da jedoch der p62/SQSTM1-spezifische Antikörper als auch der verwendete *T. gondii* SAG1-spezifische Antikörper aus der Maus stammen, konnte eine gleichzeitige Toxoplasmen-Färbung nicht durchgeführt werden.

Bereits in nicht stimulierten Zellen zeigt sich aufgrund des IFN $\gamma$ -unabhängigen Promotors des verwendeten Konstrukts ein basales Proteinlevel von GFP-mGBP2. Ebenfalls kann eine geringe p62/SQSTM1-Expression (Abbildung 6, obere Bildreihe) detektiert werden. Auch in den nicht stimulierten Proben kommt es zu einer punktuellen Kolokalisation von p62/SQSTM1 und mGBP2 (Abbildung 6, obere Bildreihe, Pfeil). Durch die Stimulation mit IFN $\gamma$  kommt es zu einer erhöhten Expression von p62 und auch zu einer Vermehrung der Vesikel, in denen p62/SQSTM1 und GFP-mGBP2 kolokalisieren (Abbildung 6, zweite Bildreihe, Pfeil). Nach Infektion mit *T. gondii* ist eine Kolokalisation beider Proteine mit der PV zu erkennen (Abbildung 6, unterste Bildreihe). So rekrutieren beide Proteine, mGBP2 und p62/SQSTM1, an die PV des Parasiten. Es ist möglich, dass entweder mGBP2 die Rekrutierung von p62/SQSTM1 initiiert oder umgekehrt. Ob die Proteine ihre Rekrutierung gegenseitig beeinflussen, wird weiter im Verlauf dieser Arbeit analysiert (Abschnitt 4.2.7).

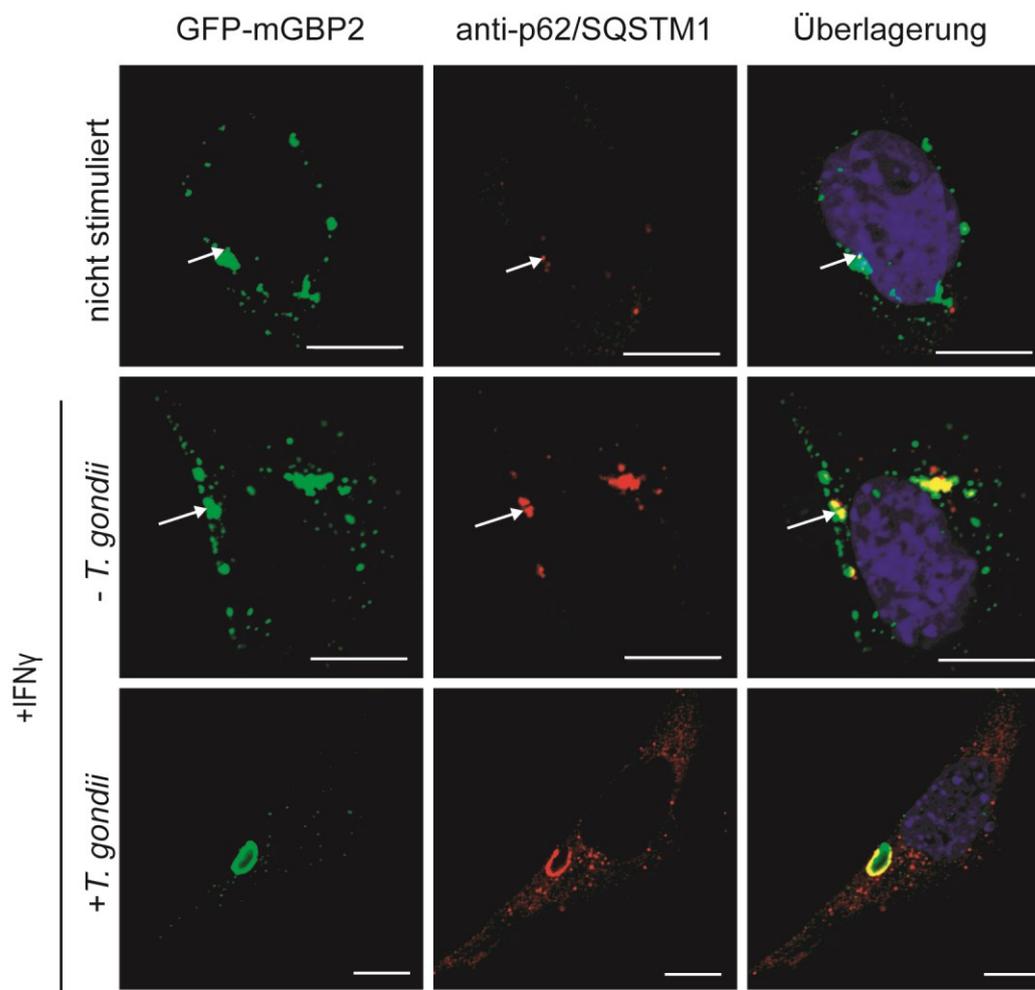


Abbildung 6: Kolokalisationsstudie zwischen mGBP2 (grün) und p62 (rot) in GFP-mGBP2 rekonstituierten *mGBP2*<sup>-/-</sup> MEFs, in der dritten Spalte wird die Überlagerung gezeigt. Die MEFs wurden über Nacht unstimuliert gelassen (Zeile 1) oder mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag entweder mit *T. gondii* infiziert (Zeile 3) oder Kontrollzellen nicht infiziert (Zeile 2) Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

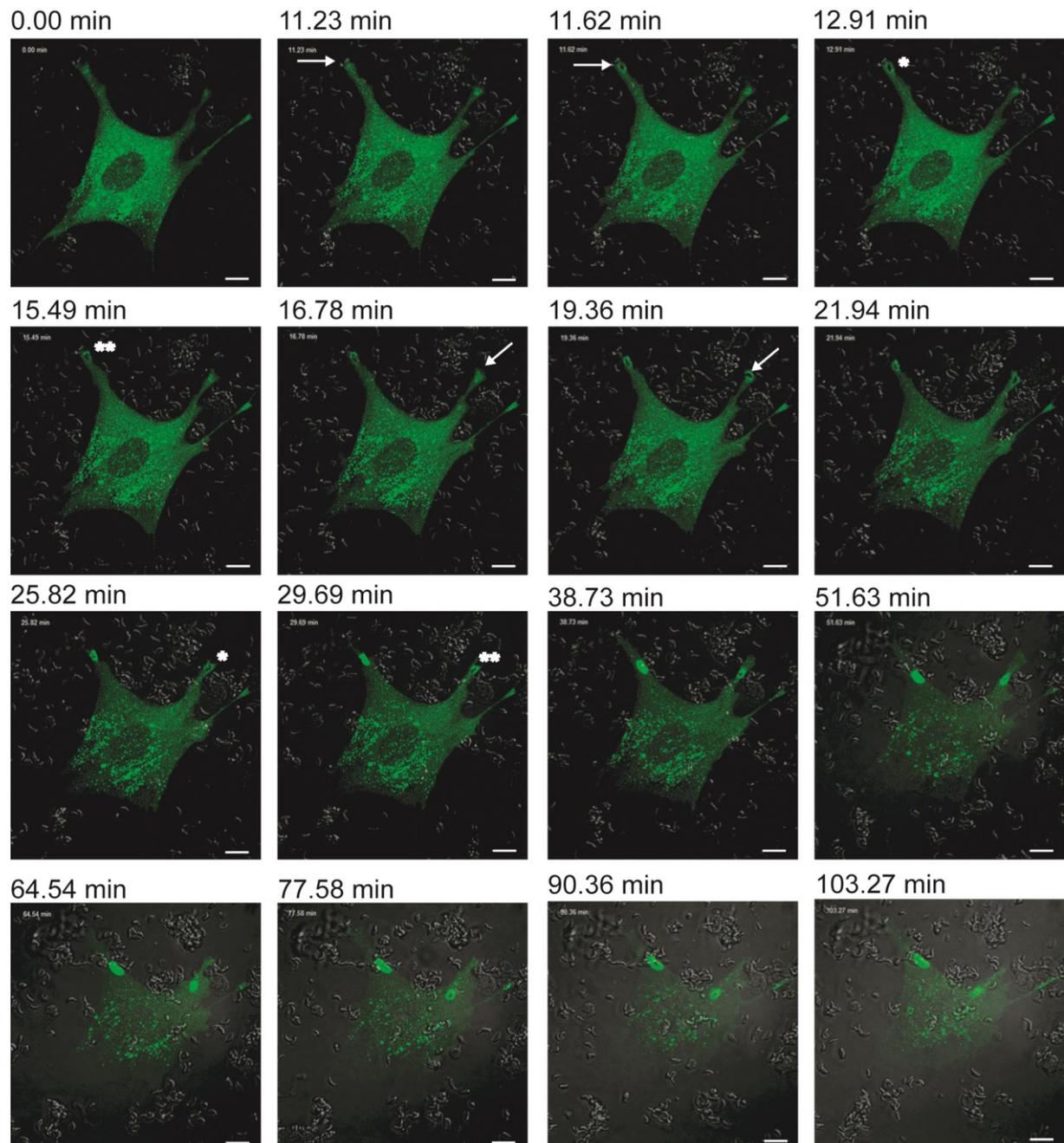
## 4.2 Erkennung von *T. gondii* und Signaltransmission nach Infektion *in vitro*

### 4.2.1 Live cell imaging

Aus vorangegangenen Versuchen ist bereits bekannt, dass es sich bei der Rekrutierung der mGBPs zu der PV um einen sehr schnellen Prozess handelt. Bereits 10-20 min nach Infektion können erste mGBP-positive parasitophore Vakuolen detektiert werden. Diese Ergebnisse wurden bisher nur in statischen Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt (Degrandi et al., 2007). Ziel war es, die Rekrutierung der mGBP-Vesikel in Echtzeit mittels *live cell imaging* zu beobachten.

Dazu wurden GFP-mGBP2 exprimierende MEFs über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* infiziert. Direkt nach Zugabe der Toxoplasmen auf die Zellen wurden die

Filmaufnahmen gestartet. Noch bevor die Zelle von Parasiten befallen wird, ist die Dynamik der GFP-mGBP2-Vesikel zu beobachten.



**Abbildung 7: Live cell Imaging** von IFN $\gamma$ -stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs. Gezeigt sind Ausschnitte aus dem Film des *live cell imaging* Video 01; GFP-mGBP2 exprimierende Zellen wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und anschließend mit *T. gondii* infiziert. Der Verlauf der Infektion wurde gefilmt. Die Pfeile markieren das Eindringen von *T. gondii* Organismen. Die \* zeigen erste kolokalisierende Vesikel, bzw. \*\* stärkeres mGBP2 Signal am *Toxoplasma*. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

In Abbildung 7 sind Ausschnitte aus dem *live cell imaging* Film (Video 01, der Arbeit beigefügt) gezeigt. Man sieht, wie nach ca. 11 min ein erster Parasit in die Zelle eindringt (markiert durch einen Pfeil). Bereits eine Minute später zeigen sich erste punktuelle GFP-mGBP2-Signale an der PVM (Abbildung 7, Bildreihe 1; 12.91 min, markiert durch

einen \*). Das GFP-mGBP2-Signal wird über die Zeit stärker (Abbildung 7, Bildreihe 2, 15.49 min, \*\*). Nach ca. 16 min invadiert ein weiterer Parasit die Zelle (16.78 min). Diesmal dauert es länger, bis GFP-mGBP2 Signale mit der PVM kolokalisieren (Abbildung 7, Bildreihe 3, \*). Die Parasiten wandern von den peripheren Eintrittsstellen weiter in die Zelle Richtung Kern (Sinai et al., 1997). Im Verlauf der Beobachtung zeigt sich eine Verstärkung des GFP-mGBP2-Signals um die PV herum. Nachfolgend wird die frühe Ansammlung an GFP-mGBP2 um den Parasiten noch einmal vergrößert dargestellt (Abbildung 9) sowie einzelne Vesikel-Dynamiken genauer beschrieben (Abbildung 8 -Abbildung 12).

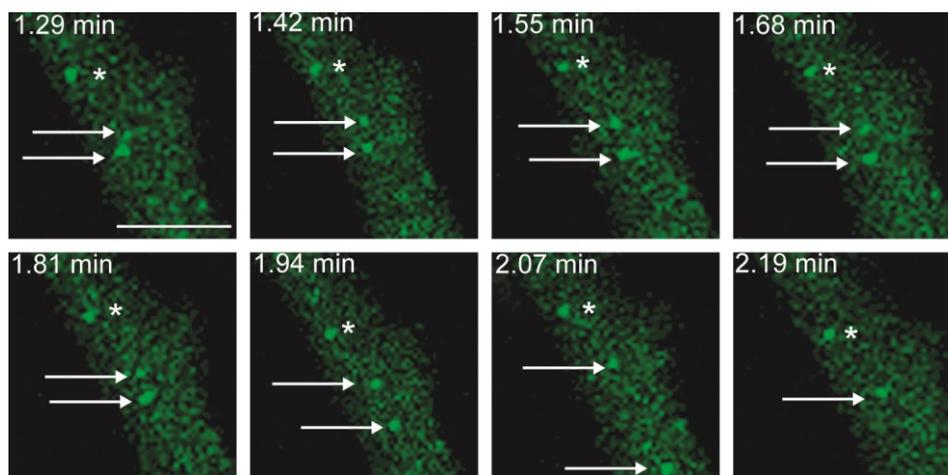


Abbildung 8: *Live cell imaging* von IFN $\gamma$  stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs; Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Film, fokussiert auf einen oberen Zellausläufer. Dargestellt ist die Vesikel-Bewegung noch vor *T. gondii* Infektion. Das \* markiert einen relativ statischen Vesikel, der sich kaum bewegt. Die Pfeile sind zur Verfolgung zweier Vesikel, die sich beide erst auch nur gemäßigt bewegen, plötzlich bewegt sich der untere Vesikel schnell aus dem Bildfokus. Im letzten Bild ist der untere Vesikel nicht mehr zu sehen. Der Maßstabsbalken in Bild 1 (1.29 min) stellt 5  $\mu$ m dar.

Während der Aufnahmen ist zu erkennen, dass GFP-mGBP2 Vesikel direkt nach Invasion des Parasiten in die Zelle mit der PV verschmelzen. Allerdings zeigte sich auch, dass die Rekrutierung der Vesikel in den überexprimierenden Zellen weniger gerichtet ist, als dass es ein dynamischer Prozess von Verschmelzung und Abspaltung (*fusion and fission*) ist. Des Weiteren lässt sich beobachten, dass es nur geringfügig zur Verschmelzung einzelner Vesikel mit der PV Membran kommt. Es sieht mehr so aus, als würden Proteine aus den Vesikel ins Zytosol entlassen werden (Vesikel werden kleiner) und dann an der PVM anlagern.

Dabei gibt es Vesikel, die sich nur geringfügig im Zytosol hin- und herbewegen und es gibt Vesikel, die plötzlich größere Distanzen zurücklegen (Abbildung 8).

In Abbildung 9 ist gezeigt, wie sich kurz nach *T. gondii* Invasion in die Zelle, ein GFP-mGBP2 Signal um die PV herum aufbaut. Man erkennt keinen gezielten Vesikeltransport, es handelt sich vielmehr um eine Akkumulierung von zytosolischem GFP-mGBP2 Proteinen um die PV herum.

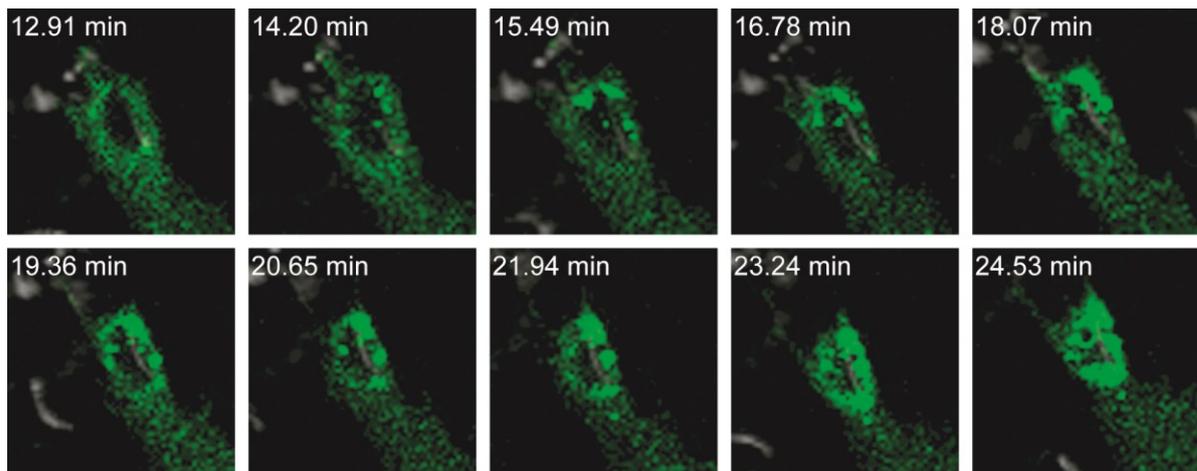


Abbildung 9: *Live cell imaging* von IFN $\gamma$  stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Film fokussiert auf den Parasiten, der als erstes in die Zelle eingedrungen ist. Es wird gezeigt, wie sich ein GFP-mGBP2-positives Signal um die PVM herum bildet.

In Abbildung 10 ist ein weiterer Ausschnitt aus dem Film gezeigt, es wird der zweite eingedrungene Parasit (zum Zeitpunkt 16.78 min) vergrößert gezeigt. Im Film ist zu sehen, dass GFP-mGBP2-Vesikel, die sich in unmittelbarer Nähe der *T. gondii* PV befinden, immer kleiner werden und sich letztendlich aufgelöst zu haben scheinen (Abbildung 10, untere Bildreihe 83.78 min). Im Film ist deutlich zu sehen, dass die Vesikel nicht gerichtet an die PVM wandern und mit ihr verschmelzen, vielmehr werden diese stetig kleiner und lösen sich letztendlich auf.

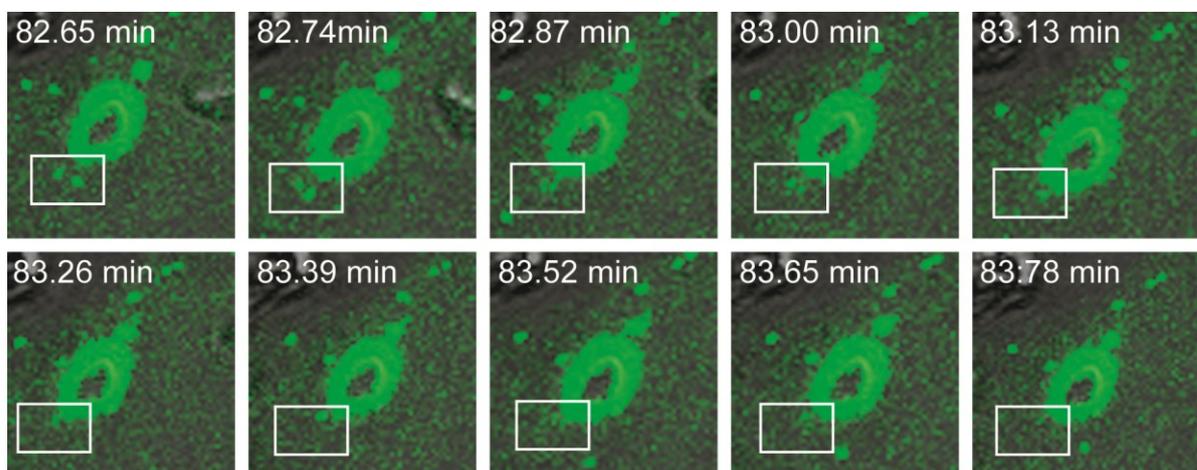


Abbildung 10: *live cell imaging* von IFN $\gamma$  stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Film fokussiert auf den Parasiten, der als zweites in die Zelle eingedrungen ist. Es wird gezeigt, wie GFP-mGBP2-positive Vesikel in PVM-Nähe (s. Kasten) immer kleiner werden und sich letztendlich auflösen und verschwinden (83.78 min).

Die GFP-mGBP2 positiven Vesikel zeigen eine ausgeprägte Dynamik, dabei konnten verschiedene Prozesse beobachtet werden. In Abbildung 11 ist die Interaktion zwischen zwei Vesikeln zu sehen. Es scheint, als fusioniere einer der beiden Vesikel zunächst mit der PVM (Abbildung 11, Bildreihe 1, Zeit 90.10 - 90.19 min), der sich aber auch wieder

abspaltet. Daraufhin fusionieren beide Vesikel miteinander (Abbildung 11, Bildreihe 2, Zeit 90.62 min). Außerdem sieht man, dass sich in unmittelbarer Nähe des verschmolzenen Vesikels ein neues Vesikel bildet und ebenfalls mit dem vorher beschriebenen Vesikel verschmilzt (Abbildung 11, Bildreihe 2, Zeit 91.26 min).

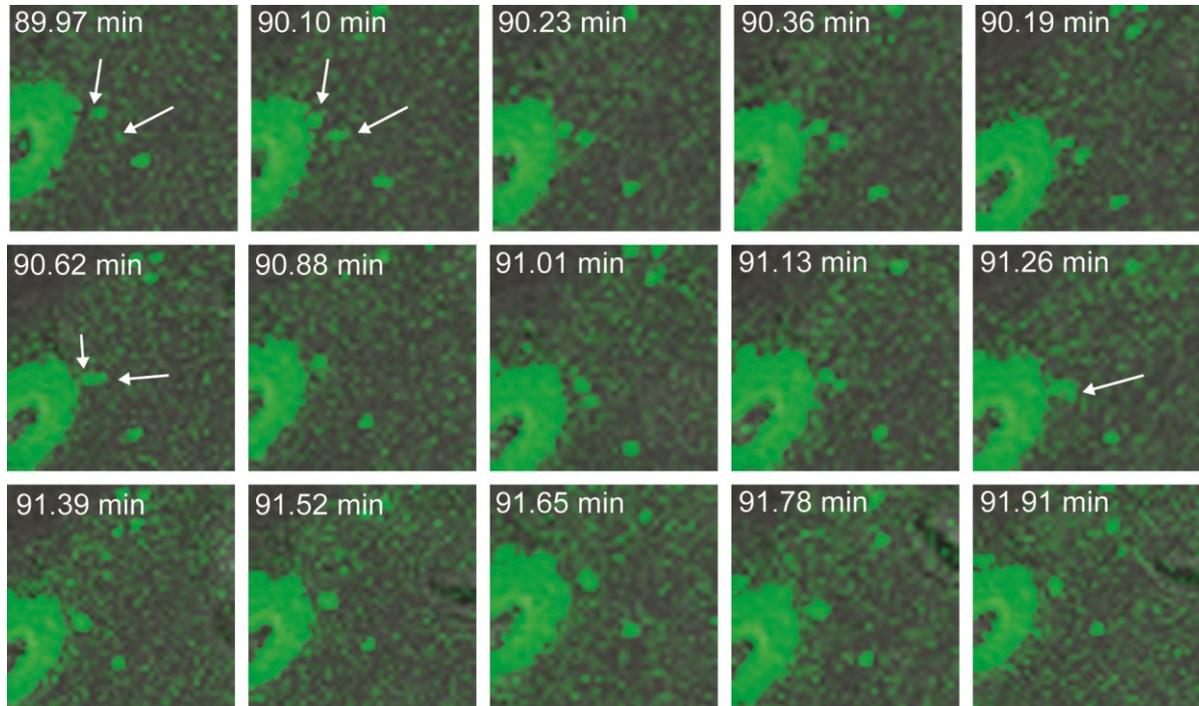


Abbildung 11: *Live cell imaging* von IFN $\gamma$ -stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Film fokussiert auf den Parasiten, der als zweites in die Zelle eingedrungen ist. Es wird die Dynamik zweier GFP-mGBP2 positiver Vesikel dargestellt. Die Vesikel, die verfolgt wurden, sind durch Pfeile markiert.

Bevor die *live cell imaging* Aufnahmen vorlagen, wurde erwartet, dass die mGBP2 positiven Vesikel sich gezielt als Ganzes auf die PVM zubewegen. Es konnte aber auch beobachtet werden, wie sich Vesikel scheinbar teilen und nur ein Teil des Vesikels sich gerichtet auf die PVM hinzu bewegt (Abbildung 12). Der andere Teil wird im Zeitverlauf kleiner und löst sich letztendlich auf, wie es bereits in Abbildung 10 gezeigt wurden.

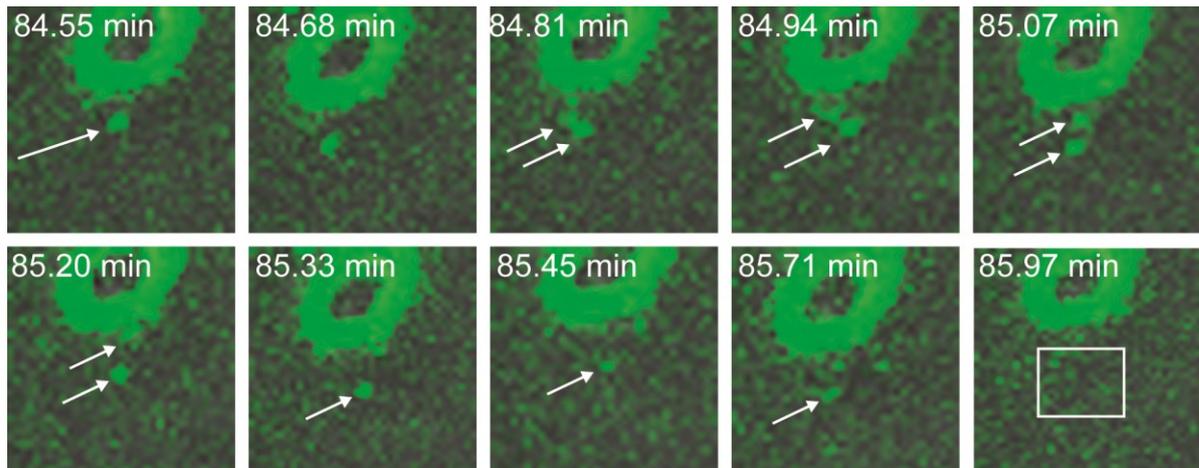


Abbildung 12: *Live cell imaging* von IFN $\gamma$  stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Film fokussiert auf den Parasiten, der als zweites in die Zelle eingedrungen ist. Es wird die Dynamik eines Vesikels verfolgt, der im ersten Bild durch einen Pfeil markiert ist.

Weiterhin sollte beobachtet werden, was im Verlauf der Infektion mit den mGBP2-positiven PV passiert. Dazu wurden GFP-mGBP2 Zellen transient mit einem mCherry-exprimierenden Konstrukt transfiziert, diese über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für *live cell imaging* Experimente eingesetzt. Diesmal wurden die Zellen mit *T. gondii* infiziert und für 1 h bei 37°C im Inkubator inkubiert. Dann wurde am Mikroskop nach intrazellulären Parasiten gesucht, die von GFP-mGBP2 umgeben waren. Diese wurden schließlich gefilmt. Im Verlauf des Films (Video 02, der Arbeit beigefügt) zeigte sich, dass die Membran der PV geschädigt wird, denn das zytosolische mCherry-Protein zeigt sich ab einem bestimmten Zeitpunkt schlagartig auch im Innenraum der parasitophoren Vakuole, welche zuvor als dunkle Aussparung innerhalb des Zytoplasmas erscheint. Dies ist ein Hinweis darauf, dass mGBP2-positive PVs auf eine bislang unbekannt Art und Weise geschädigt werden, sodass möglicherweise weitere Abwehrmechanismen Zugang zum Parasiten erlangen können.

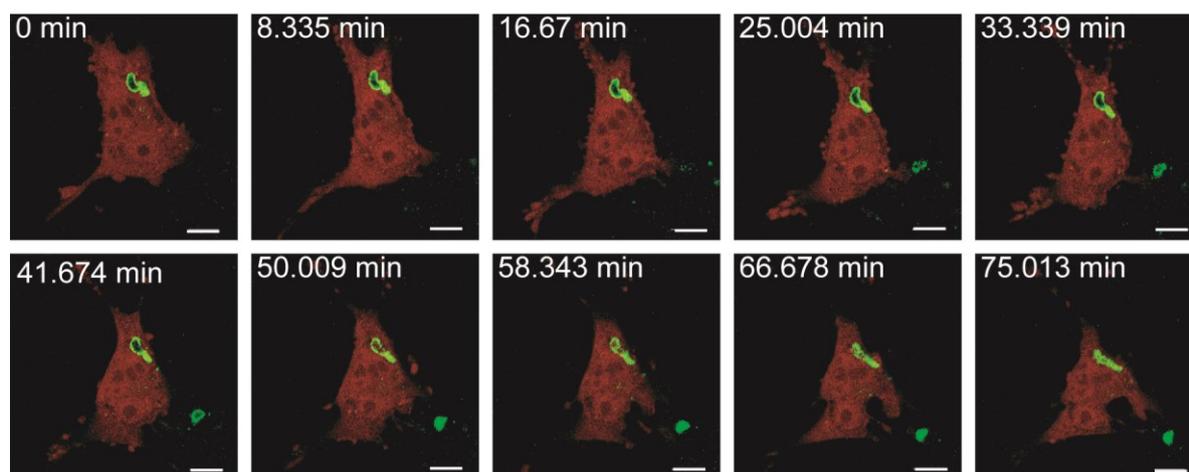


Abbildung 13: *Live cell imaging* mit mCherry- (rot) exprimierenden, über Nacht mit IFN $\gamma$  stimulierten GFP-mGBP2-rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs (Video 02). Gezeigt ist der Filmverlauf in Ausschnitten. Disruption der PVM in Bildreihe 2 zwischen 41.647 und 50.009 Minuten.

Der Film (Video 02) zeigt den Verlauf einer *T. gondii* Infektion *in vitro*. Die Zeitpunkte wurden notiert, ab denen die Beobachtung beginnt. Aufgrund der unbeobachteten Vorinkubation der Zellen mit den Parasiten im Inkubator, kann kein genauer Zeitpunkt nach Infektion angegeben werden.

Eine Disruption der PVM und ein Eindringen von zytosolischem mCherry auch im periparasitophoren Vakuolenraum ist in Abbildung 13, untere Bildreihe zwischen den Zeitpunkten 41,647 und 50,009 Minuten zu erkennen. Die Disruption der PVM wird im Folgenden im Detail betrachtet (Abbildung 14). Hier sieht man, dass ca. 49 min nach Beobachtung die PVM so angegriffen wurde, dass zytosolisches mCherry auch in der PV zu finden ist.

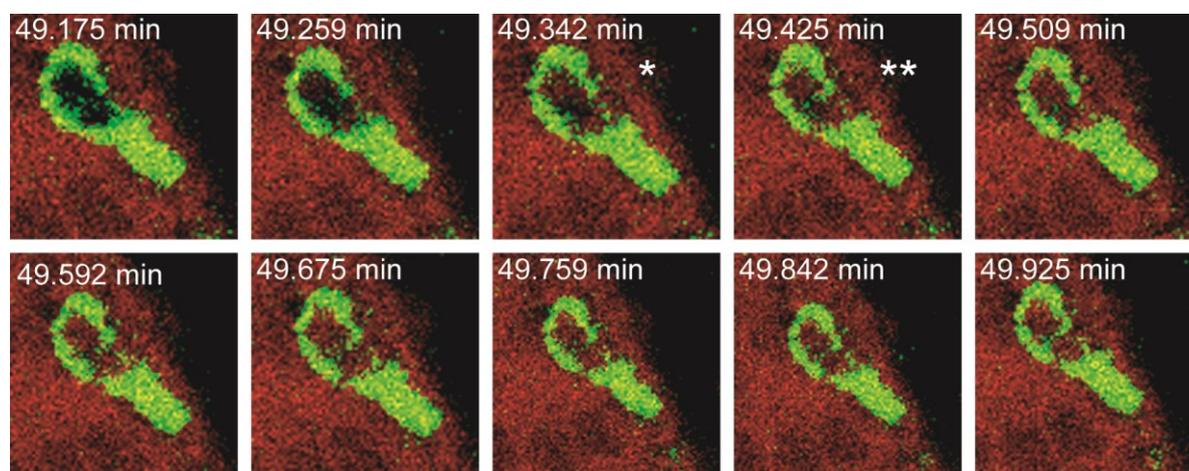


Abbildung 14: *Live cell imaging* mit mCherry- (rot) exprimierenden, über Nacht mit IFN $\gamma$  stimulierten GFP-mGBP2-rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs (Video 02). Gezeigt ist ein Ausschnitt fokussiert auf zwei mGBP2-positive intrazelluläre Parasiten. Verfolgt wird die Disruption der PVM. Die Schädigung der PV-Membran zeigt sich in der oberen Bildreihe, 3. Bild (\*), hier können ersten mCherry-Proteine in der PV detektiert werden, das Signal nimmt daraufhin zu (4. Bild \*\*).

Eine Beobachtung im *live cell imaging* war, dass schon bereits in den ersten Sekunden des Filmes (Video 03) ein *Toxoplasma* die GFP-mGBP2 umlagerte PV verlässt und durch die Zelle hin zur Plasmamembran und aus der Zelle wieder heraus tritt (Abbildung 15).

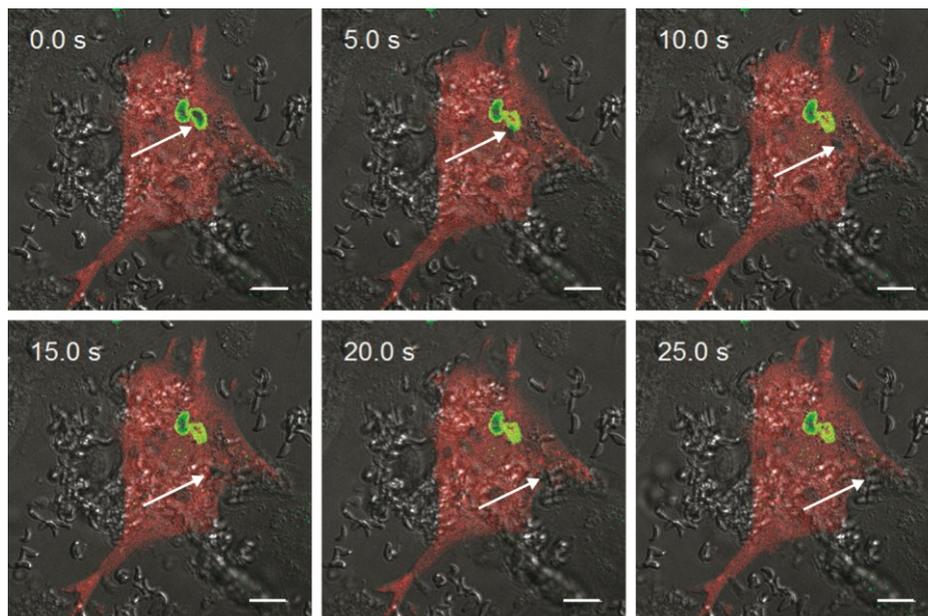


Abbildung 15: *Live cell imaging* mit mCherry (rot) exprimierenden, über Nacht mit IFN $\gamma$  stimulierten GFP-mGBP2 rekonstituierten mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs (Video 03). Gezeigt ist ein MEF infiziert mit zwei Toxoplasmen. Zu Beginn des Films (0.0s) sind beide PVs ausgefüllt mit den Parasiten. Bei 5.0s verlässt der eine Parasit aus der PV, die sich daraufhin mit mCherry füllt und der Parasit verlässt die Zelle (markiert mit einem Pfeil). Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

#### 4.2.2 mGBP2 Lokalisation in MyD88 defizienten MEFs

Bisher ist nur wenig über die Funktionalität der verschiedenen mGBPs bekannt. Die IFN $\gamma$ -induzierte Expression und vor allem die gezielte Lokalisationsänderung nach *T. gondii* Infektion und die erhöhte Suszeptibilität der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus (Degrandi et al., 2013) zeigen die Bedeutung der mGBPs während der Immunabwehr. Bisher ist dennoch nicht bekannt, welche Signale die Lokalisationsänderung der mGBPs nach Infektion initiieren.

Aufgrund der möglichen Funktion der GTPasen während der Immunkontrolle ist ein Zusammenhang mit Rezeptoren des angeborenen Immunsystems denkbar. Innerhalb dieser Rezeptoren spielen die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) eine große Rolle in der angeborenen Immunität. Sie erkennen spezifisch Strukturen verschiedener Pathogene (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*). Ein Beispiel ist hier TLR4, welches Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien erkennt (Beutler, 2000; Hoshino et al., 1999). Nach Aktivierung der TLRs durch die Erkennung von pathogenassoziierten Molekülen kommt es zu einer Signalkaskade, an deren Ende die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und die Expression immunologischer Effektorproteine stehen. Innerhalb dieser Signalkaskade kommt es zur Aktivierung verschiedener Kinasen, durch die das Rezeptorsignal weitergeleitet wird (Kumar et al., 2009). Nach Aktivierung der TLRs bindet zuerst das Adaptorprotein MyD88 an den zytoplasmatischen Teil des TLRs. Die Aktivierung von MyD88 bildet folglich einen zentralen Schritt in der Signalübertragung der meisten TLRs (Kumar et al., 2009).

Um zu testen, ob die Aktivierung von TLRs die Rekrutierung der mGBPs zur parasitophoren Vakuole auslöst, wurden nachfolgend MyD88 -efiziente (MyD88<sup>-/-</sup>) MEFs für Lokalisationsstudien eingesetzt (Adachi et al., 1998). Die MEFs wurden wie beschrieben über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag mit *T. gondii* infiziert. In der Fluoreszenzfärbung wurde mGBP2 und Sag1 als *Toxoplasma* Marker gefärbt. Anschließend wurde die Kolokalisation von mGBP2 und parasitophoren Vakuolen am Mikroskop analysiert.

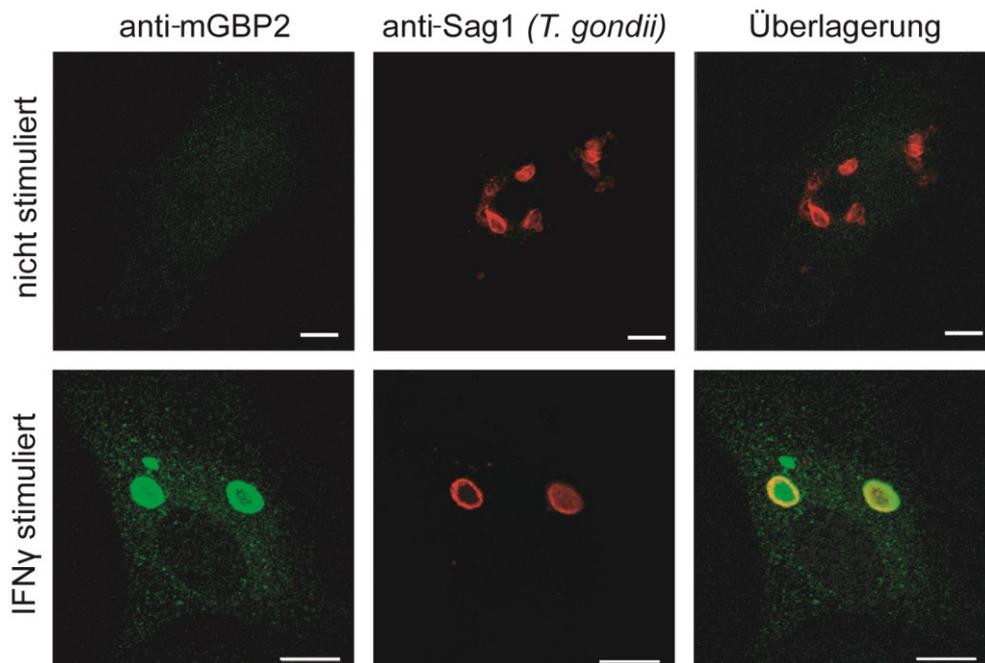


Abbildung 16: Kolokalisation zwischen mGBP2 und *T. gondii* in MyD88 defizienten MEFs; MyD88 defiziente Fibroblasten wurden mit IFN $\gamma$  stimuliert oder nicht behandelt und anschließend mit *T. gondii* infiziert. mGBP2 (grün) wurde mit Hilfe eines spezifischen Kaninchen Antiserums detektiert und mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper visualisiert (Cy2, grün). *T. gondii* wurde mittels eines *Toxoplasma*-spezifischen Maus-anti-Sag1 Antikörpers detektiert und mit einem Sekundärantikörper (Cy3, rot) markiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

In den unstimulierten Proben ist wie erwartet nur eine sehr geringe endogene mGBP2-Expression zu detektieren. Die Expression von mGBP2 wird durch IFN $\gamma$  induziert und nach Infektion kommt es auch in MyD88-defizienten MEFs zu einer Kolokalisation zwischen mGBP2 und der parasitophoren Vakuole. Das zeigt, dass die Signalübertragung von den TLRs über MyD88 für die Lokalisationsänderung von mGBP2 keine Rolle spielt.

### 4.2.3 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die mGBP-Rekrutierung zur *T. gondii* PV

#### 4.2.3.1 Zytoskelett-Abhängigkeit der Translokation von mGBP2 zur PV

Vesikulärer Proteintransport erfolgt häufig entlang von Mikrotubuli bzw. mit Hilfe Mikrotubuli-assoziiierter Motorproteine. Mikrotubuli spielen eine wichtige Rolle während des Transports verschiedener Proteine nicht nur zwischen dem ER und dem Golgi-Komplex (Lippincott-Schwartz et al., 1990; Saraste und Svensson, 1991), sondern auch während allgemeiner Transportprozesse von Proteinen oder Zellorganellen innerhalb der Zellen. Es ergibt sich die Frage, ob die Lokalisationsänderung der mGBP Vesikel Mikrotubuli abhängig ist. Spezifische Mikrotubuli-Inhibitoren können verwendet werden, um Mikrotubuli-abhängige Prozesse innerhalb der Zelle aufzuklären. Daher wurden im folgendem Versuch murine embryonale Fibroblasten mit Mikrotubuli-Inhibitoren inkubiert und daraufhin die Kolokalisation von mGBP2 mit der parasitophoren Vakuole analysiert. Es wurden Nocodazol, Paclitaxel und Tubulozol verwendet. Die Substanzen greifen alle in die Mikrotubulidynamik ein und verhindern somit den Mikrotubuli-abhängigen Transport (Lee et al., 2011; Nogales, 1999; Schiff und Horwitz, 1980). Nocodazol bindet Tubulindimere und Polymere, durch eine Konformationsänderung im Tubulin wird eine Polymerisierung verhindert (Lee et al., 1980). Tubulozol bindet ebenfalls Tubulin und verhindert somit die Polymerisierung. Paclitaxel stabilisiert den Abbau von Mikrotubulielementen, indem es  $\beta$ -Tubulin bindet und so die GTP-gebundene Situation simuliert (Nogales, 1999; Schiff und Horwitz, 1980). Die Stabilisierung verhindert die für den Neuaufbau notwendige Dynamik des Mikrotubuliauf- und -abbauprozesses. Zunächst wurden GFP-mGBP2 exprimierende MEFs für 2 h mit jeweils 4  $\mu$ M Inhibitor inkubiert. Es zeigte sich kein Effekt auf die Rekrutierung von mGBP2 zur parasitophoren Vakuole. Daraufhin wurde die Inkubationszeit der Inhibitoren auf 10 h verlängert. Simultan wurden die Zellen über Nacht mit 100 U IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für 2 h mit *T. gondii* infiziert. Anschließend erfolgte eine Fluoreszenzfärbung von Sag1 mittels Antikörper.

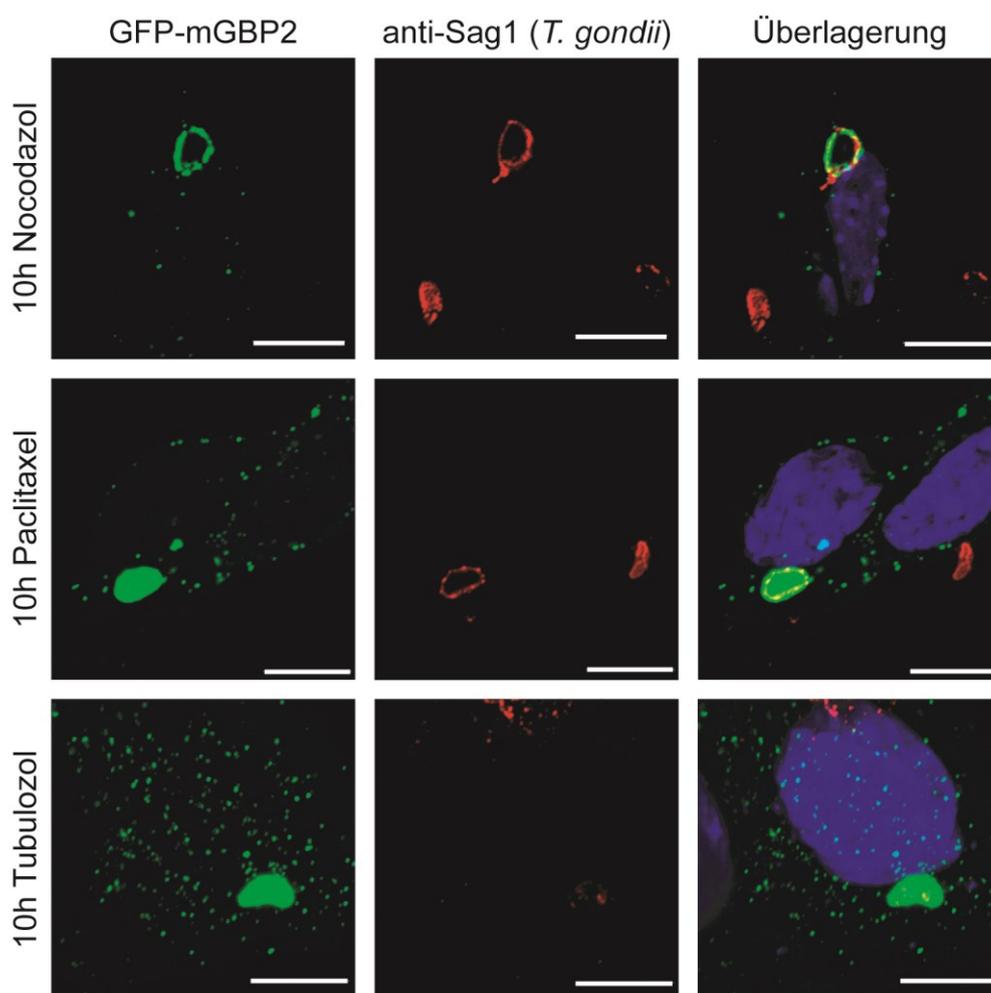


Abbildung 17: Analyse der *in vitro* Anwendung von Mikrotubuli-Inhibitoren auf die mGBP2 Rekrutierung zur PV. Die MEFs wurden mit IFN $\gamma$  über Nacht stimuliert oder Kontrollen unbehandelt gelassen (nicht gezeigt), die Inkubation der Inhibitoren (4  $\mu$ M Endkonzentrationen) erfolgte für 10 h vor der Infektion mit *T. gondii*. Analysiert wurde die Kolokalisation zwischen GFP-mGBP2 (grün) und intrazellulären *T. gondii* (rot). Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Da es sich um GFP-mGBP2 überexprimierende Zellen handelt (GFP-mGBP2 Expression unter einem IFN $\gamma$  unabhängigen Promotor), ist die Expression von mGBP2 auch ohne IFN $\gamma$  Stimulation gegeben (nicht gezeigt). Allerdings kommt es zu keiner Kolokalisation mit der PV in unstimulierten Zellen. Auch eine zehnstündige Inkubation mit den Mikrotubuli-Inhibitoren beeinflusste die Rekrutierung von mGBP2 zur parasitophoren Vakuole nicht, sodass der Prozess der Lokalisationsänderung der mGBP2-Vesikel Mikrotubuli-unabhängig zu sein scheint.

#### 4.2.3.2 Untersuchungen der Abhängigkeit der mGBP2-Translokation von ERK1/2, intrazellulärem Kalzium und der Proteinkinase C

Toxoplasmen sowie auch andere intrazelluläre Parasiten haben verschiedene Strategien entwickelt, um den Immunabwehrreaktionen des Wirts zu entgehen. Zum Beispiel inhibiert der Parasit verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (Butcher et al., 2005; Shapira et al., 2002) und STAT1 $\alpha$  (Luder et al., 2001). Ein entscheidender

Mechanismus bei *T. gondii* ist die Bildung der parasitophoren Vakuole bereits während des Eindringens in die Wirtszelle. Durch sie soll eine Erkennung durch den Wirt verhindert und eine Replikationsnische innerhalb des Wirtszytoplasmas geschaffen werden (Joiner et al., 1994; Schwab et al., 1994). In dieser ist der Parasit geschützt vor verschiedenen antimikrobiellen Effektorproteinen des Wirtes. Trotz aller Schutzmechanismen vor der Wirtszellabwehr, werden durch die Infektion mit *T. gondii* verschiedene proinflammatorische Signalwege aktiviert. Auch extrazelluläre Parasiten oder Parasitenbestandteile können Signalwege in der Wirtszelle aktivieren, wie die Mitogen-aktivierte-Protein Kinase (MAPK) ERK1/2 (*extracellular-signal regulated Kinase*) (Abi Abdallah et al., 2012; Kim und Denkers, 2006; Valere et al., 2003). Valere et al. konnten zeigen, dass ein Höhepunkt der ERK1/2-Aktivierung bereits 10 min nach Infektion mit *T. gondii* vorlag.

Da auch die mGBP-Rekrutierung zur PV bereits nach 10 min zu beobachten ist, könnte ein Zusammenhang zwischen einer ERK1/2-Aktivierung und der Lokalisationsänderung der mGBP2 Vesikel nach *Toxoplasma* Infektion bestehen. Die Signalweiterleitung durch zelluläre Mitogen-aktivierte Proteinkinasen könnte somit wichtig für die mGBP Rekrutierung sein. Daher wurden Lokalisationstudien durchgeführt unter Einfluss eines spezifischen ERK1/2 Inhibitors, U0126 (Favata et al., 1998). Hierbei wurden die Zellen wie zuvor über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für 2 h bei 37°C mit dem Inhibitor (10  $\mu$ M) inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *T. gondii* für weitere 2 h. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung wie zuvor beschrieben (Methoden 3.1.5).

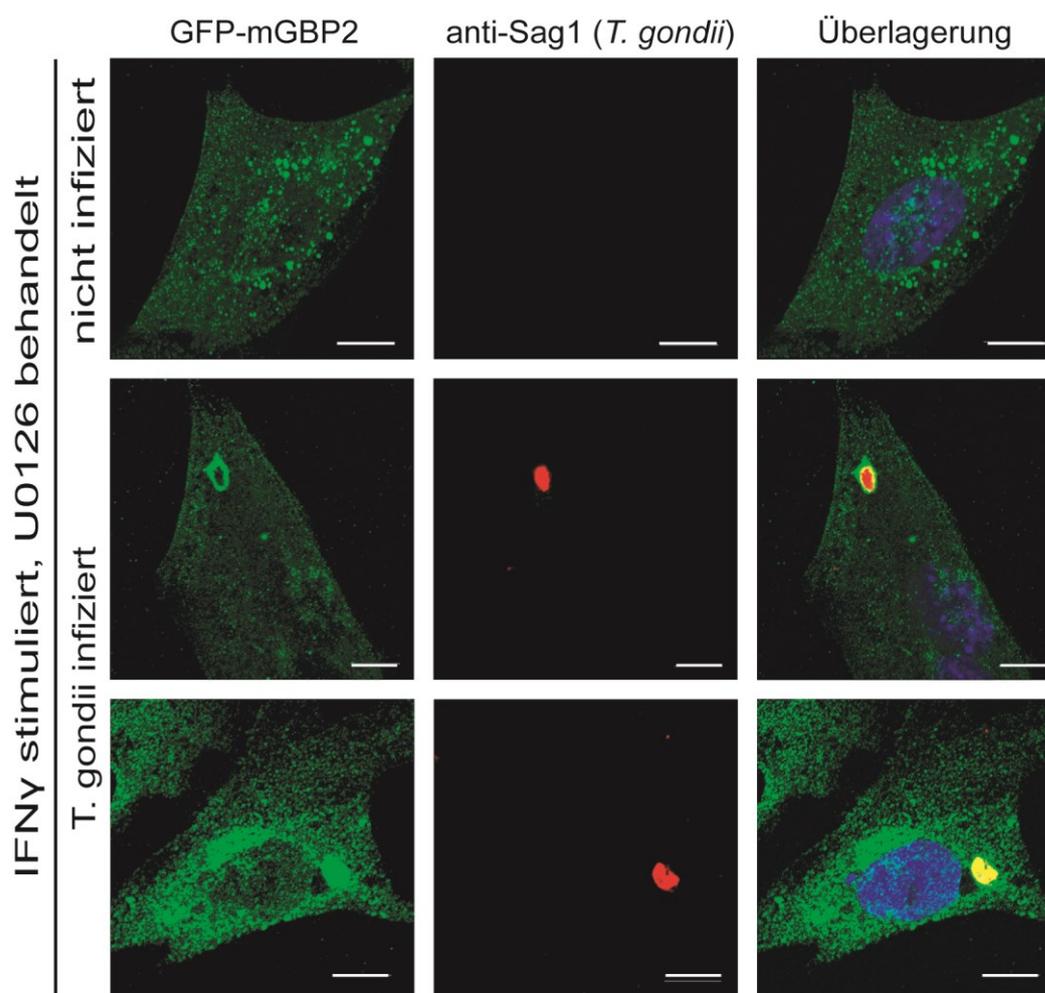


Abbildung 18: *In vitro* Anwendung von ERK1/2 Inhibitor U0126; Die GFP-mGBP2 exprimierenden MEFs wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für 2h mit dem Inhibitor (10  $\mu$ M) inkubiert und für weitere 2h mit *T. gondii* infiziert. Es wurde die Kolo-kalisation von GFP-mGBP2 (grün) und intrazellulären Toxoplasmen (rot) analysiert. Die Maßstabsbalken geben eine Länge von 10  $\mu$ m wieder.

Die Anwendung des Inhibitors U0126 hatte keinen Einfluss auf die Expression von mGBP2 (Abbildung 18, obere Bildreihe). Nach Infektion mit *T. gondii* konnte eine Ansammlung von mGBP2 um die parasitophore Vakuole herum beobachtet werden wie zuvor im Versuchsaufbau ohne Inhibitor (Abbildung 18, Bildreihe 2 und 3). Der Versuch zeigt, dass die Rekrutierung von mGBP2 unabhängig von der ERK1/2-Aktivierung ist.

Nach *Toxoplasma* Invasion wird eine weitere Kinase aktiviert, die Proteinkinase C (Masek et al 2006). Vielversprechend bei der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch *T. gondii* ist, dass dies bereits 5 bis 15 min nach Infektion zu beobachten ist (Masek et al., 2006). Somit ist die Aktivierung der PKC und die Translokation der Untereinheiten ein sehr schneller Prozess nach *T. gondii* Infektion, ähnlich schnell erfolgt die mGBP Rekrutierung zur PV. Um einen Zusammenhang zwischen PKC Aktivierung und mGBP2 Rekrutierung zu testen, wurden Lokalisationsanalysen unter Einfluss des PKC Inhibitors Gö6976 durchgeführt (Martiny-Baron et al., 1993). Der Inhibitor wurde in Konzentrationen von 1-5  $\mu$ M 60 min vor *T. gondii* Infektion zu den MEFs gegeben. Es

folgte die Infektion mit *T. gondii* und die Immunfluoreszenzfärbung wie zuvor beschrieben (Methoden 3.1.5).

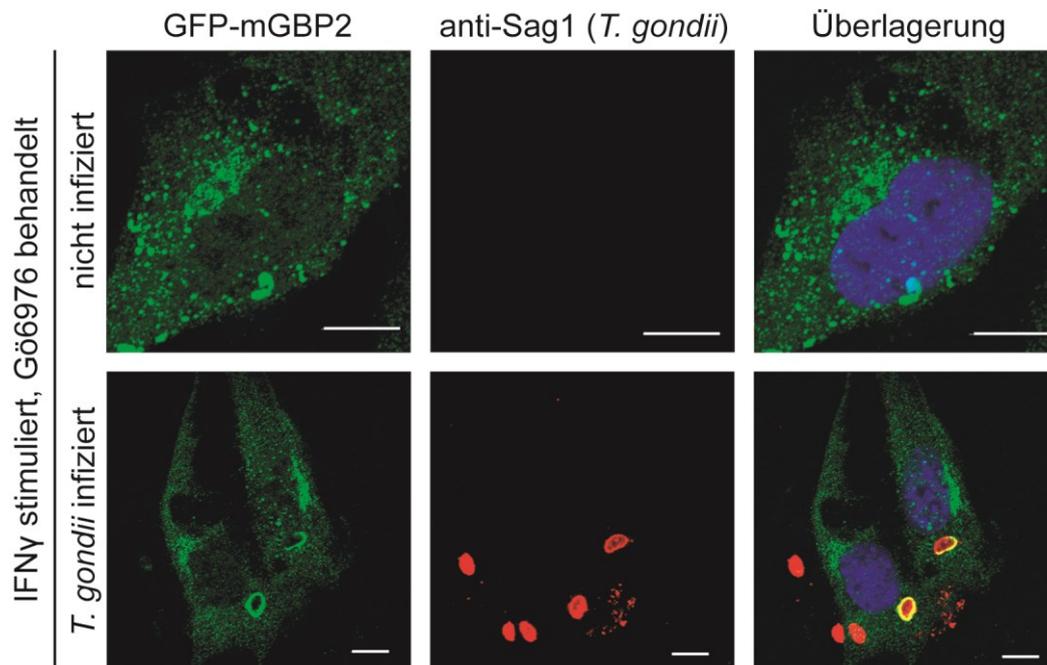


Abbildung 19: mGBP2 Lokalisation nach Gö6976-Inkubation und *T. gondii* Infektion; die Zellen wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und eine Stunde vor Infektion mit *T. gondii* mit dem Inhibitor inkubiert. Es wurde die Kolokalisation von GFP-mGBP2 (grün) und intrazellulären Toxoplasmen (rot) analysiert. Die Maßstabsbalken zeigen 10  $\mu$ m.

Der Versuch in Abbildung 19 zeigt, dass die Rekrutierung der mGBP2-Vesikel zur parasitophoren Vakuole nicht durch den PKC-Inhibitor Gö6976 beeinflusst wird.

Wie bereits beschrieben, wird während der Invasion von *T. gondii* in die Wirtszelle die parasitophore Vakuole gebildet. Diese assoziiert nach Invasion über ihre zytoplasmatische Oberfläche schnell mit dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien (Sinai et al., 1997). Die biologische Signifikanz dieser Interaktion ist noch nicht ausreichend aufgeklärt. Sowohl über das ER als auch über die Mitochondrien wird das intrazelluläre Kalzium- ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Level reguliert. Intrazelluläres Kalzium ist beteiligt an der Wirtszellreaktion auf mikrobielle Produkte in verschiedenen Infektionsmodellen (Goldfine und Wadsworth, 2002; Goodridge et al., 2003; Yadav et al., 2004). Außerdem konnte ein Einfluss auf intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Mengen durch *T. gondii* Lysat beobachtet werden (Aliberti et al., 2003). Hinzu kommt ein zugeschriebener proinflammatorischer Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  in Lymphozyten (Dolmetsch et al., 1997; Dolmetsch et al., 1998). Diese vorangegangenen Beobachtungen führen zu der Hypothese, dass  $\text{Ca}^{2+}$  die Erkennung von *T. gondii* und die anschließenden Signalkaskaden beeinflussen könnte. Es wurde getestet, ob intrazelluläre Kalziumspiegel auch einen Einfluss auf die Kolokalisation zwischen mGBPs und der PV haben. Dazu wurden MEFs über Nacht stimuliert und am nächsten Tag unter Depletion von extrazellulären und intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  infiziert (Methoden 3.3).

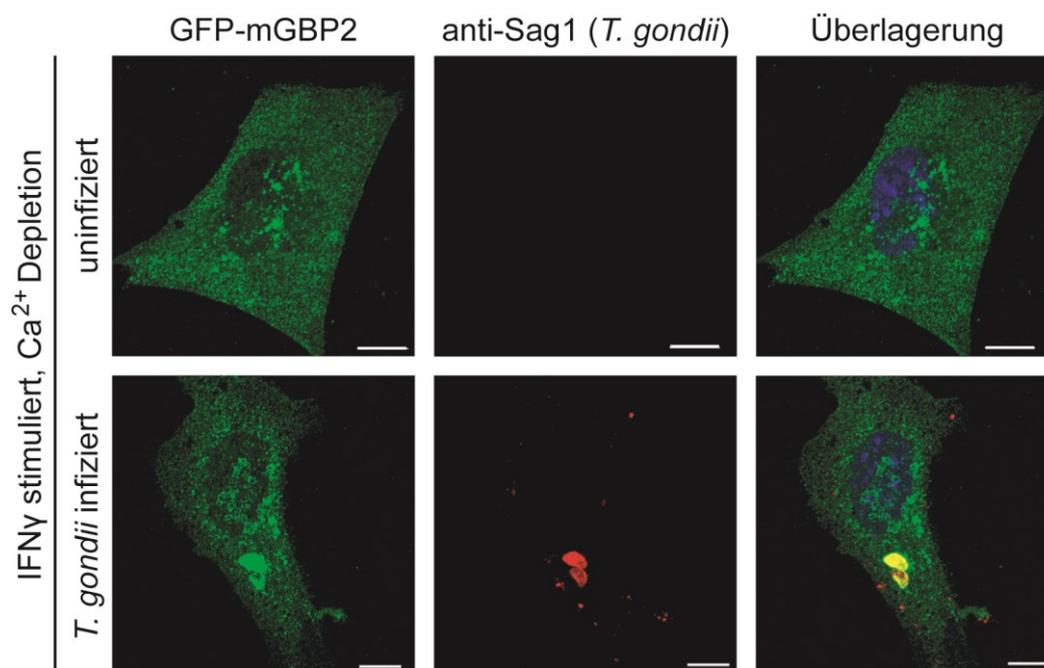


Abbildung 20: Lokalisation von GFP-mGBP2 unter kalziumdepletierenden Bedingungen. Die mGBP2-Lokalisation ist auch im unstimulierten Zustand nicht beeinflusst (obere Bildreihe). Nach Infektion kommt es zur Rekrutierung von GFP-mGBP zum intrazellulären *T. gondii* (rot). Die Maßstabsbalken bilden 10  $\mu\text{m}$  ab.

Die basale Expression von mGBP2 wird durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -depletierende Medium nicht beeinträchtigt (Abbildung 20). Auch nach Infektion scheint intrazelluläres Kalzium keinen Einfluss auf die Relokalisation von mGBP2 zur PV zu haben, denn diese ist wie unter normalen Bedingungen zu beobachten.

#### 4.2.4 Identifizierung eines für die Rekrutierung von mGBPs zur *T. gondii* PV wichtigen Sequenzmotivs

Bisher konnte kein Signal oder Rezeptor identifiziert werden, der zur Rekrutierung der mGBPs zur parasitophoren Vakuole führt. Allerdings konnte für mGBP2 die Isoprenylierungsstelle am C-terminalen Proteinende als notwendig für die Rekrutierung identifiziert werden (Degrandi et al., 2013). Aber nicht alle rekrutierenden mGBPs besitzen dieses Isoprenylierungsmotiv, daher muss es andere Motive geben, die die Lokalisation an der PV beeinflussen.

Im Nachfolgenden sollte dies für mGBP6 bzw. mGBP10 aufgeklärt werden. Die Besonderheit dieser beiden mGBP Vertreter liegt darin, dass sie eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Sie unterscheiden sich lediglich in 14 Aminosäuren, allerdings lokalisieren sie unterschiedlich nach *T. gondii* Infektion. Während mGBP6 nach IFN $\gamma$ -Stimulation und *T. gondii* Infektion an der PV akkumuliert und eine

Kolokalisation zu beobachten ist, verbleibt mGBP10 in seiner zytoplasmatischen Verteilung und kolokalisiert nicht mit der *T. gondii* PV (Abbildung 21) (Degrandi et al., 2007). Durch die hohe Sequenzähnlichkeit und das divergierende Verhalten nach *T. gondii* Infektion sollte durch Austausch definierter Domänen bzw. Aminosäuren ein Motiv identifiziert werden, welches für die Rekrutierung wichtig ist.

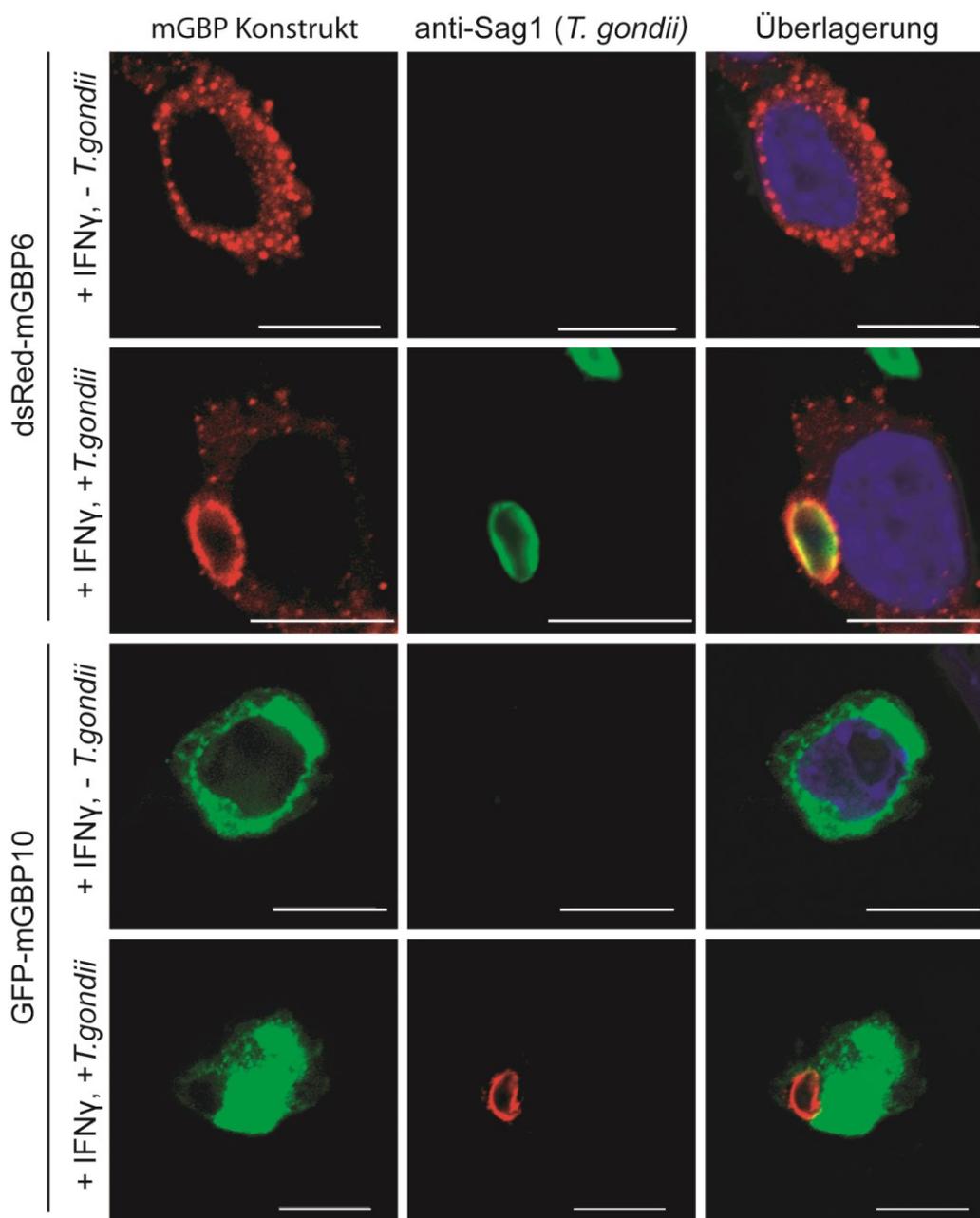


Abbildung 21: Lokalisation von mGBP6 WT und mGBP10 WT. dsRed-mGBP6 (rot) zeigt eine vesikuläre, zytoplasmatische Verteilung nach IFN $\gamma$ -Stimulation (erste Bildreihe) und rekrutiert nach *T. gondii* Infektion an die PV des intrazellulären Parasiten (grün). GFP-mGBP10 zeigt eine weniger ausgeprägte vesikuläre Struktur (dritte Bildreihe, grün) und rekrutiert auch nach *T. gondii* Infektion nicht an die PV des intrazellulären Parasiten (rot, unterste Bildreihe). Die Maßstabsbalken zeigen 10  $\mu$ m.

#### 4.2.4.1 mGBP10/6 Hybrid-Protein

Um den Abschnitt im Protein zu identifizieren, der wichtig für die Relokalisation ist, wurde zunächst ein Hybrid-Protein aus mGBP6 und mGBP10 kloniert. Dazu wurden die Sequenzen mittels PCR (Methoden 3.4.5) vervielfältigt und mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut. Anschließend folgte die Ligation der geschnittenen Fragmente mit jeweils dem geschnittenen Gegenpart von mGBP6 bzw. mGBP10 (siehe Abbildung 22).

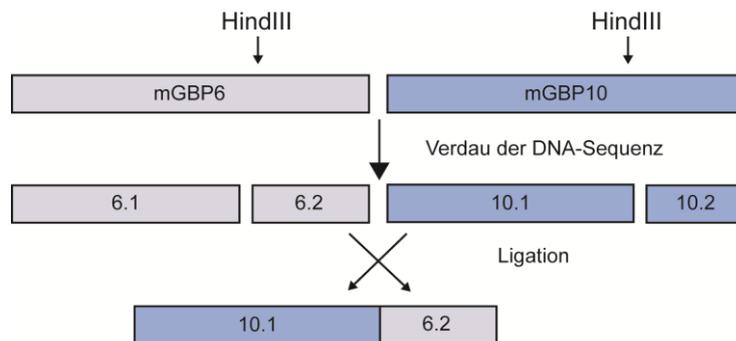


Abbildung 22: Schema der Herstellung des mGBP6/10-Hybrid-Proteins. Die kodierende Sequenz wurde zunächst vervielfältigt, dann mittels *HindIII* verdaut und die entsprechenden Proteinfragmente wieder ligiert. Hierbei wurde der N-terminale Teil von mGBP10 (mGBP10.1) mit dem C-terminalen Teil (mGBP6.2) von mGBP6 zusammengefügt.

Das so entstandene „Hybrid-Protein“ wurde N-terminal mit einem GFP-Tag versehen, stabil in NIH3T3 Fibroblasten transduziert (Methoden, 3.1.3) und die Lokalisation nach *T. gondii* Infektion analysiert.

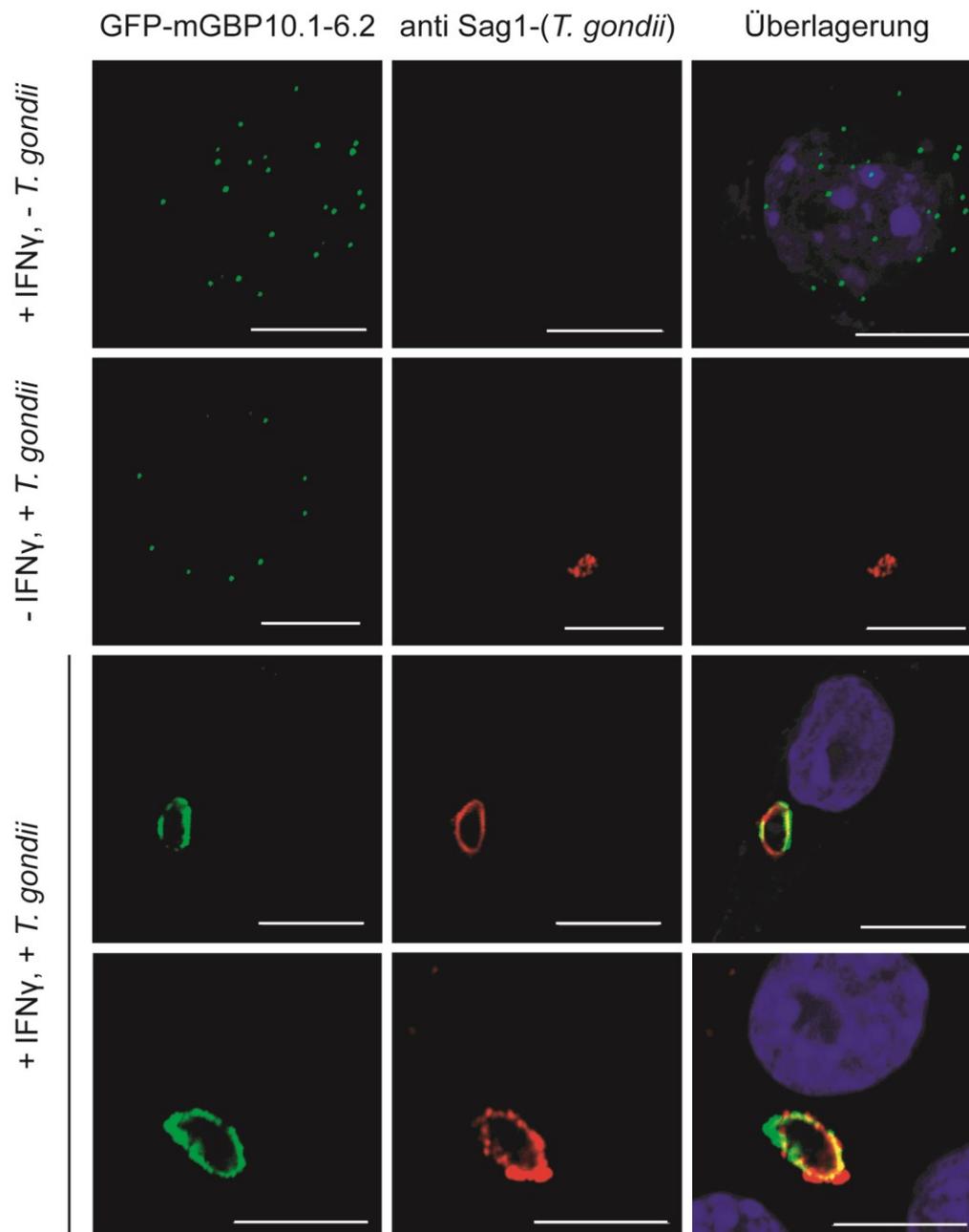


Abbildung 23: Lokalisation des mGBP10.1-6.2 Hybrid-Proteins. NIH3T3 Fibroblasten wurden stabil transduziert und über Nacht mit oder ohne IFN $\gamma$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 2 h mit *T. gondii* infiziert und die Lokalisation des Hybridproteins analysiert.

Wie erwartet zeigt der Versuch mit wildtypischen mGBP6-Protein eine Lokalisationsänderung nach IFN $\gamma$ -Stimulation und *T. gondii* Infektion. Wie beschrieben verbleibt wildtypisches mGBP10 in der zytoplasmatischen Verteilung auch nach *T. gondii* Infektion (Abbildung 21).

Das klonierte Hybridprotein mGBP10.1-6.2 zeigt eine ähnliche vesikuläre Verteilung im Zytoplasma wie wildtypisches mGBP6 (Abbildung 23, Bildreihe 1). Nach Infektion mit *T. gondii*, aber ohne Stimulation mit IFN $\gamma$  (Abbildung 23, Bildreihe 2), kommt es zu keiner Rekrutierung an die PV. Erst im IFN $\gamma$ -stimulierten Zustand kommt es nach *T. gondii* Infektion zu einer Rekrutierung des Hybridproteins zur PV des intrazellulären Parasiten (Abbildung 23, Bildreihe 3 und 4). Somit weisen die mGBP10.1-6.2 Hybrid-

Proteine ein Rekrutierungsverhalten wie wildtypisches mGBP6 auf und es lässt sich schlussfolgern, dass der C-terminale Proteinteil wichtig für die Rekrutierung an die PV ist.

### **4.2.4.2 mGBP6/mGBP10 Mutationsanalyse**

Um das für die PV-Lokalisation wichtige Motiv genauer bestimmen zu können, wurden Mutationsanalysen durchgeführt. Hierzu wurden gezielt Punktmutationen in die mGBP6 Sequenz eingefügt. Dadurch wurden je nach Kombination einzelne oder mehrere Aminosäuren so mutiert, wie sie in der mGBP10 Sequenz zu finden sind (Abbildung 24). Dies erfolgte mittels Mutagenese-PCR (Methoden, 3.4.6), anschließend wurden die Konstrukte mittels Sequenzanalyse auf die korrekte Mutation überprüft. In Tabelle 2 sind die verwendeten Mutationskonstrukte aufgeführt. Ziel des Versuchs war es, eine Veränderung der mGBP6-Mutanten in der Lokalisation nach *T. gondii* Infektion zu beobachten. Die Mutation eines für die Rekrutierung wichtigen Motivs hätte zur Folge, dass das mGBP6-Konstrukt nicht, wie im wildtypischen Zustand an der PV akkumuliert, sondern dass das Konstrukt wie mGBP10 nach Infektion die mGBP10-typische zytoplasmatische Verteilung zeigt.

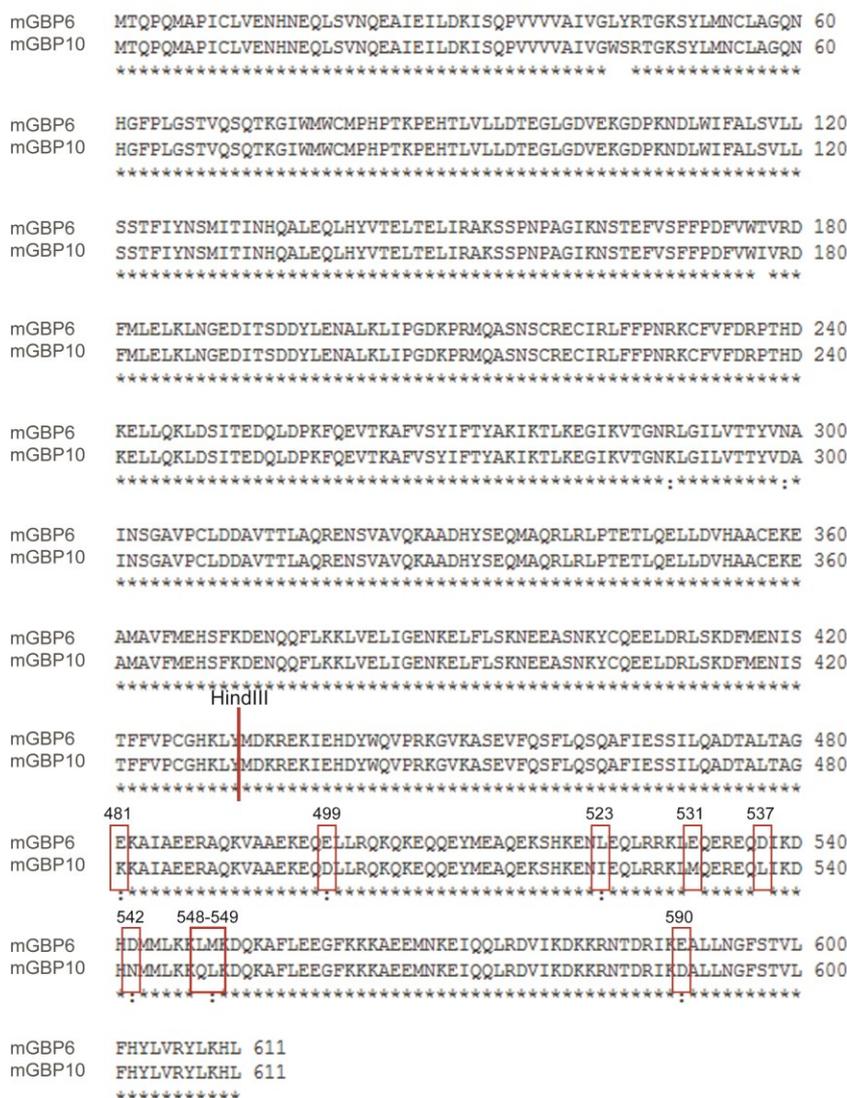


Abbildung 24: ClustalW Alignment der Proteinsequenzen von mGBP6 und mGBP10. Markiert wurde die Stelle, an der die WT-Sequenzen geschnitten (*HindIII*) und wieder ligiert wurden. Des Weiteren sind die Aminosäuren markiert und mit Positionsangaben versehen, die in den nachfolgenden Versuchen mutiert und analysiert wurden.

Tabelle 2: Überblick der Mutationen im dsRed-mGBP6-Konstrukt. Gezeigt sind die Einzelaminosäure-austausche bzw. Kombinationen von Aminosäuremutationen in einzelnen Konstrukten. Konstrukt 1 weist demnach die Mutation E499D auf, eine Mutation des Glutamins an Stelle 499 zu einer Asparaginsäure.

Konstrukt#	E481K	E499D	L523I	E531M	D537L	D542N	L548Q	M549L	E590D
1		X							
2			X						
3					X				
4	X	X		X	X				
5	X			X	X				
6							X	X	
7						X			X
8						X			
9									X

Für eine schnelle Identifizierung möglicher interessanter Klone, wurden die Mutationen in ein dsRed-mGBP6-Vektorkonstrukt eingefügt, der Vektor mittels transienter Transfektion in MEFs eingebracht und die mutierten dsRed-mGBP6-Konstrukte auf Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Zunächst wurden die Konstrukte 1 bis 5 (Abbildung 25) überprüft, ob die Mutationen hier einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins haben.

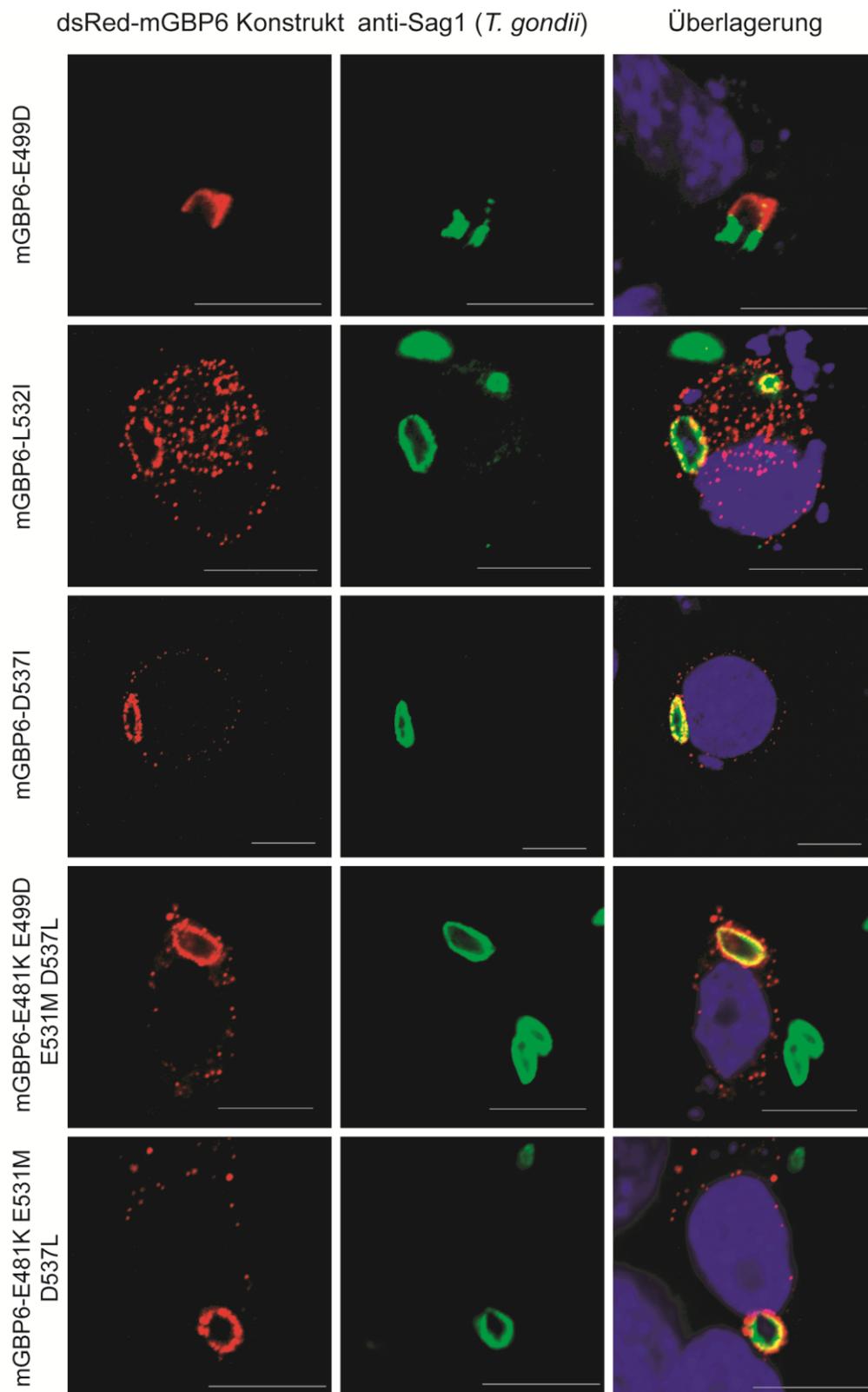


Abbildung 25: Mutationskonstrukte 1-5. MEFs wurden transient transfiziert, über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* für 2 h infiziert. Nach *T. gondii* Infektion rekrutieren die dsRed-mGBP6-Konstrukte (rot) alle zum intrazellulären Parasiten (grün). Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Abbildung 25 zeigt, dass die Lokalisation der mGBP6-Konstrukte nicht durch die Aminosäuren im Bereich zwischen Positionen 481 und 537 beeinflusst wird.

Nachfolgend wurden Konstrukte untersucht mit Mutationen im Bereich zwischen Aminosäure 542 bis zum Proteinende (Konstrukte 6-9, Abbildung 26 + Abbildung 27).

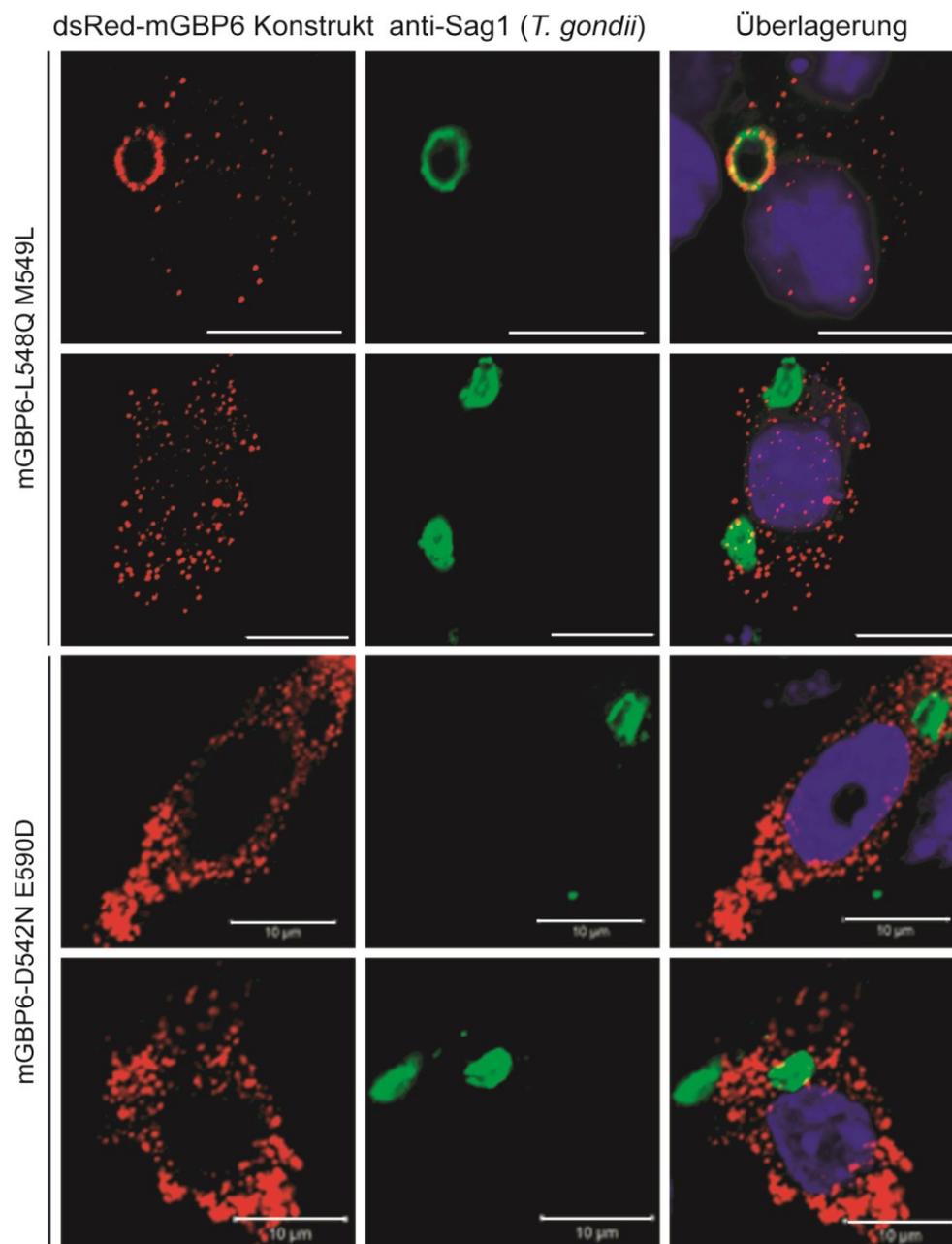


Abbildung 26: Mutationskonstrukte 6 und 7. Die MEFs wurden transient transfiziert, über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* für 2. Die Lokalisation der dsRed-mGBP6-Mutationskonstrukte (rot) wurde nach *T. gondii* Infektion (grün) analysiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Abbildung 26 zeigt die Lokalisation von dsRed-mGBP6-Mutationskonstrukten, die Mutationen im C-terminalem Proteinteil aufweisen. Diese scheinen Einfluss auf die Lokalisation nach *T. gondii* Infektion zu haben. Denn schon bei der Doppelmutante L548Q-M549L war die Fähigkeit zur Rekrutierung teilweise beeinträchtigt. Es zeigte sich ein nicht ganz eindeutiges Bild, in dem es gleichermaßen zu kolokalisierenden und weiterhin zytoplasmatisch verteilten Konstrukten kam. Eindeutiger war das Ergebnis der

mGBP6 Doppelmutante mit den Mutationen D542N und E590D (Abbildung 26, Bildreihe 3 und 4). Hier konnte nach transients Transfektion des dsRed-mGBP6-Mutationskonstrukts und IFN $\gamma$ -Stimulation eine deutlich verringerte Rekrutierung des Proteins zur PV nach *T. gondii* Infektion beobachtet werden. Nachfolgend war es interessant, ob die Doppelmutation dazu notwendig ist, oder ob die Mutation einer einzelnen Aminosäure von beiden ausreicht, um die Lokalisation zu beeinflussen.

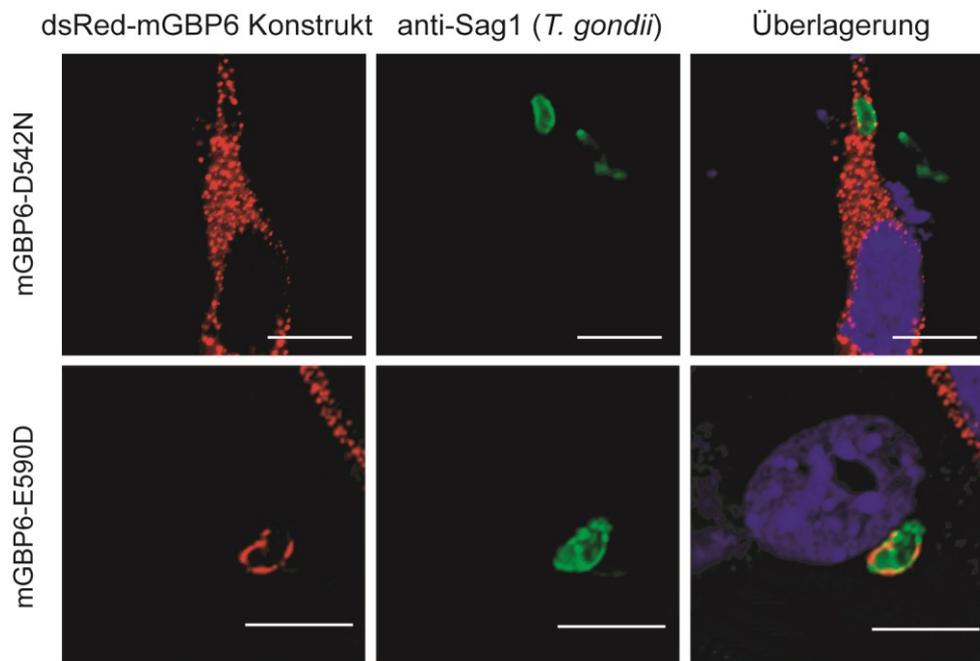


Abbildung 27: Mutationskonstrukte 8 und 9. Die MEFs wurden transient transfiziert, über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* für 2 h infiziert. Die Lokalisation der dsRed-mGBP6-Mutationskonstrukte (rot) wurde nach *T. gondii* Infektion (grün) analysiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Abbildung 27 zeigt, dass die Mutation D542N im dsRed-mGBP6-Konstrukt 8 die Lokalisation nach IFN $\gamma$ -Stimulation über Nacht und *T. gondii* Infektion beeinflusst. Es kommt zu einer verminderten Rate von rekrutierendem Protein. Der Austausch der Aminosäure in der Sequenz, wie sie in mGBP10 vorkommt, überträgt damit die nicht-rekrutierenden Eigenschaften von mGBP10 und somit spielt Asparaginsäure 542 eine wichtige Rolle für die Rekrutierung zur PVM.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele Mutationen von mGBP6 mit den korrespondierenden Aminosäuren aus mGBP10 keinen Einfluss auf die Lokalisation haben, während die Mutation D542N eine Kolokalisation verhindert.

Tabelle 3 Überblick der Mutationsanalyse von dsRed-mGBP6-Konstrukten. In der ersten Zeile ist die Mutation beschrieben und in der letzten Spalte ob die Mutation einen Effekt auf die Kolokalisation der mGBPs mit intrazellulären *T. gondii* hat.

Konstrukt	E481K	E499D	L523I	E531M	D537L	D542N	L548Q	M549L	E590D	Ko- lokalisierung
mGBP6 WT										ja
mGBP10 WT	X	X	X	X	X	X	X	X	X	nein
1		X								ja
2			X							ja
3					X					ja
4	X	X		X	X					ja
5	X			X	X					ja
6							X	X		beeinträchtigt
7						X			X	nein
8						X				<b>nein</b>
9									X	ja

Des Weiteren folgte die Untersuchung, ob analoge Aminosäuren auch in mGBP10 und mGBP2 wichtig für die Lokalisation in der Zelle und an der PV sind. Dazu wurden in wildtypischen pWPXL/GFP-mGBP10 bzw. pWPXL/GFP-mGBP2 Vektorkonstrukten die Aminosäure mutiert, die homolog zu der Aminosäure 542 in mGBP6 ist. Bei mGBP10 handelte es sich um Asparagin 542 (N542) und bei mGBP2 um die Glutaminsäure an Position 548. Damit ähnliche Bedingungen wie im Versuch mit den dsRed-mGBP6-Konstrukten vorliegen, wurden die wildtypischen und mutierten Vektorkonstrukte von mGBP2 und mGBP10 ebenfalls transient in MEFs transfiziert (Methoden, 3.1.3).

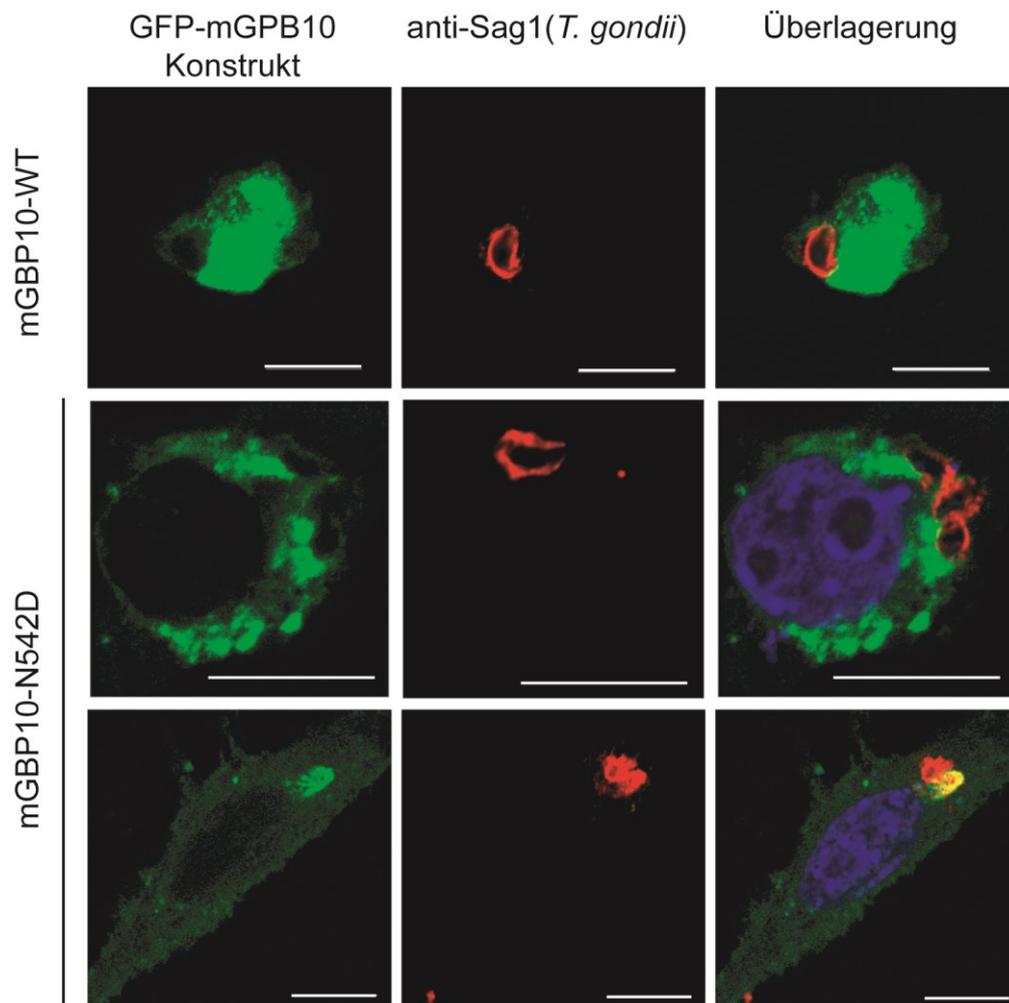


Abbildung 28: Transiente Transfektion von mGBP10-N542D-Mutationskonstrukten. Die MEFs wurden transient transfiziert, über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* für 2 h infiziert. Die Analyse der Kolokalisation von mGBP10 WT oder der N542D Mutante (grün) mit intrazellulären Toxoplasmen (rot) erfolgte mit konfokaler Mikroskopie. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Die Ergebnisse für die mGBP10-N542D-Mutante sind nicht eindeutig (Abbildung 28), in fast allen mGBP10-N542D-positiven Zellen kommt es zu keiner Rekrutierung von mGBP10 zur parasitophoren Vakuole. Allerdings kommt es vereinzelt zu einer Rekrutierung, die bei wildtypischem mGBP10 nicht zu beobachten ist (Abbildung 28, untere Bildreihe). Bei mGBP2 scheint die Mutation keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins nach *T. gondii* Infektion zu haben, es kommt weiterhin zu einer Rekrutierung zur parasitophoren Vakuole (Abbildung 29). Auffällig ist, dass das mGBP2-E548Q-Konstrukt im nicht-infizierten Zustand weniger die charakteristische, definierte vesikuläre Verteilung als andere rekrutierende mGBPs aufweist, sondern eher die zytoplasmatische Verteilung nicht rekrutierender mGBPs (wie mGBP10) zeigt (Abbildung 29, untere Bildreihe; Vergleich mit Abbildung 28 obere Bildreihe).

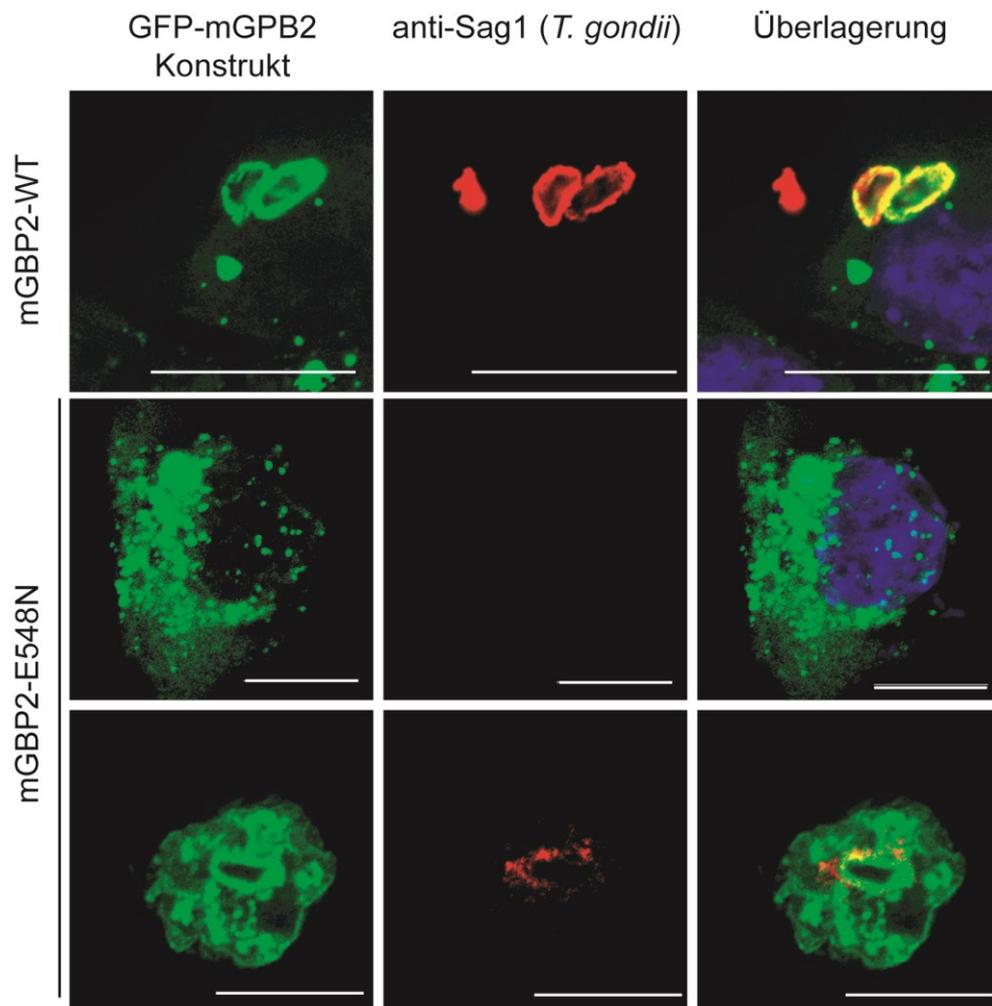


Abbildung 29: Transiente Transfektion von mGBP2-E548N Mutationskonstrukten. Die MEFs wurden transient transfiziert und über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit *T. gondii* und die Analyse der Kolo-kalisation von mGBP2 WT oder der E548N Mutante (grün) mit intrazellulären Toxoplasmen (rot). Die Maßstab-balken entsprechen 10  $\mu$ m.

Zusätzlich zur transienten Transfektion wurde eine retrovirale Transduktion der mutierten Proteine durchgeführt (Methoden 3.1.3). Hierbei wurden die mGBP6 Mutanten in einen mCherry-exprimierenden pWPXL-Vektor als Fusionsproteine kloniert. Als Kontrollen wurden ebenfalls wildtypisches mGBP6 in den genannten Vektor kloniert sowie Mutationskonstrukte, die in den vorangegangenen Untersuchungen keinen Einfluss auf die Lokalisation von mGBP6 zeigten.

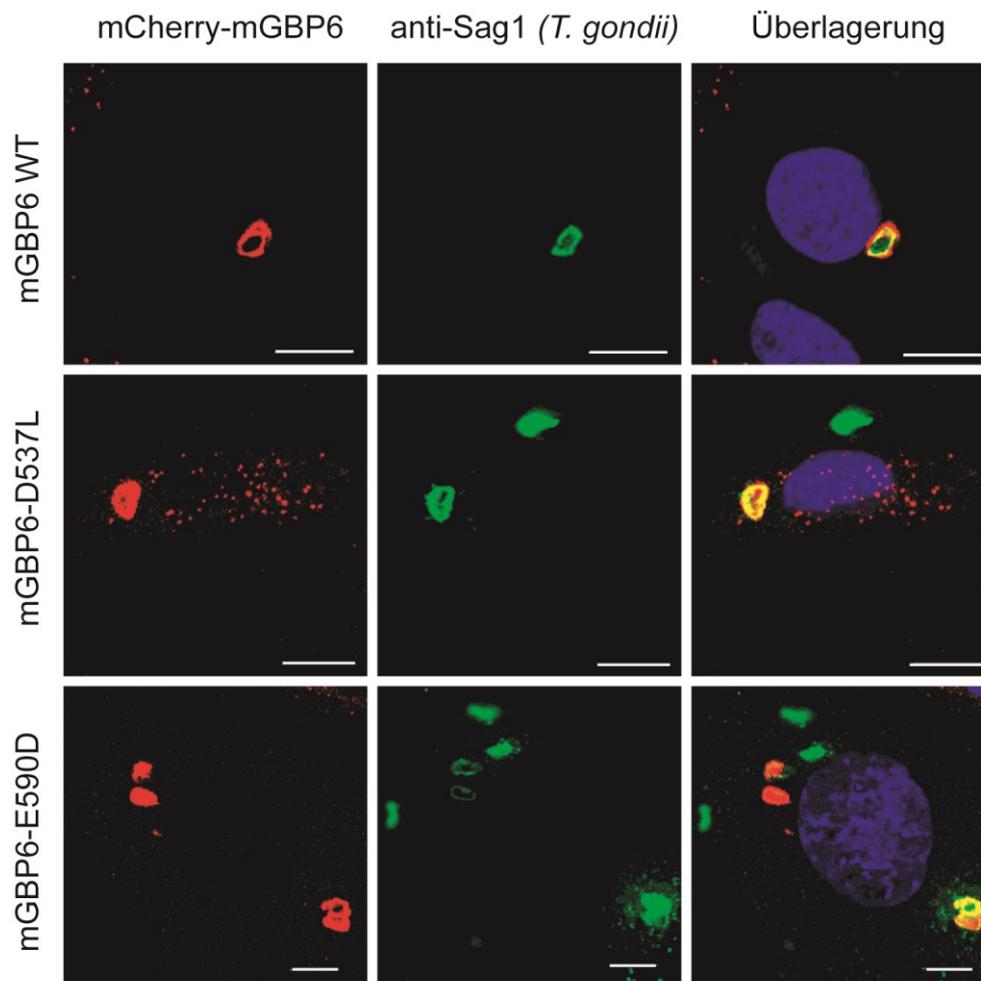


Abbildung 30: mCherry-mGBP6 stabil exprimierende MEFs. Die Zellen wurden stabil mit den jeweiligen mCherry-mGBP6 WT oder Mutationskonstrukten transduziert, nach mCherry-Expression sortiert und für die IF eingesetzt. Dazu wurden sie über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag mit *T. gondii* infiziert. Die Kolokalisation der mCherry-mGBP6-Konstrukte (rot) mit *T. gondii* (grün) wurde analysiert. Zu sehen ist mGBP6 WT und die Mutanten D537L und E590D. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Zunächst wurden die Kontrollen auf Kolokalisation von mCherry-mGBP6 und intrazellulären *T. gondii* untersucht. Es zeigte sich, dass weder die Mutation mGBP6-D537L (Abbildung 30, mittlere Bildreihe) noch die Mutation der Glutaminsäure 590 zur Asparaginsäure einen Effekt auf die Lokalisation von mCherry-mGBP6 nach *T. gondii* Infektion hatte. Diese Ergebnisse stimmen mit der transienten Transfektion der Konstrukte überein.

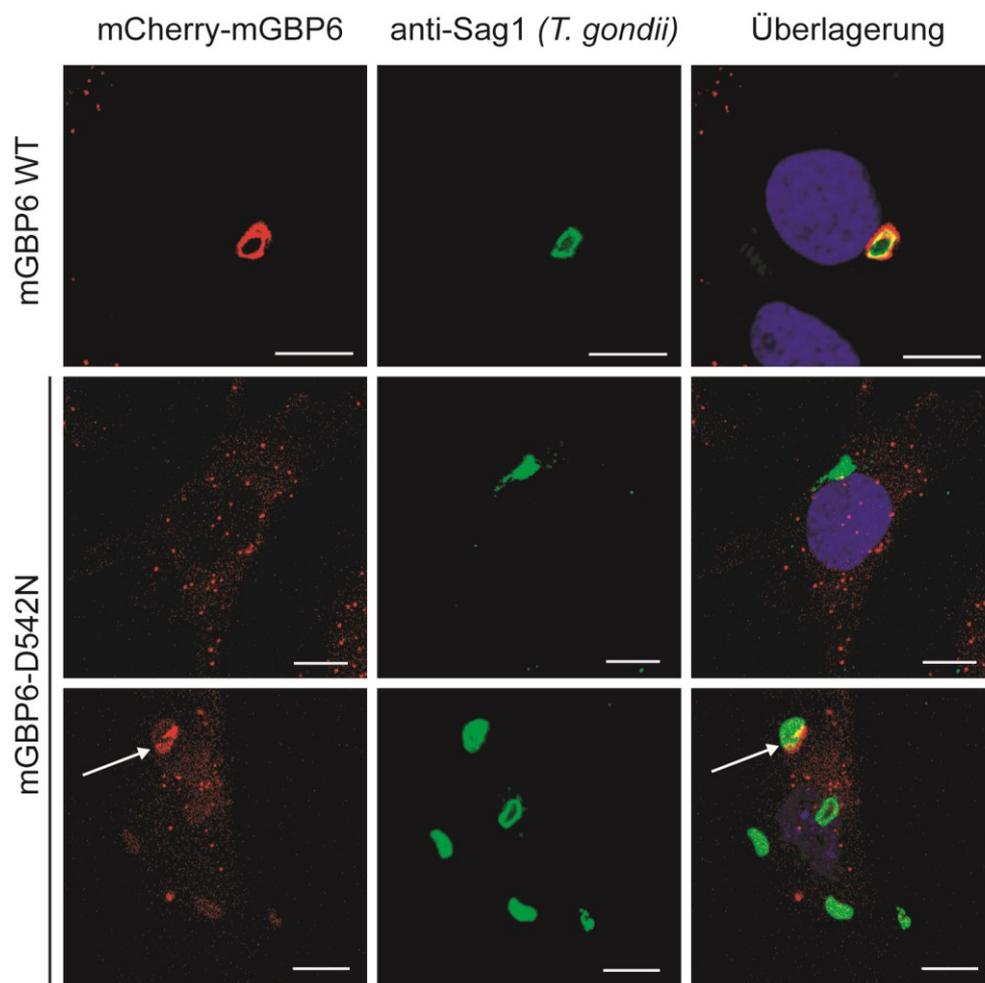


Abbildung 31: mCherry-mGBP6 stabil exprimierende MEFs. Die MEFs wurden stabil mit den jeweiligen mCherry-mGBP6 WT oder Mutationskonstrukten transduziert, nach mCherry-Expression sortiert und für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Dazu wurden sie über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag mit *T. gondii* infiziert. Die Kolokalisation der mCherry-mGBP6 Konstrukte (rot) mit *T. gondii* (grün) wurde analysiert. Zu sehen ist mGBP6 WT und die Mutante D542N. Der Pfeil markiert eine Kolokalisation von mCherry-mGBP6 mit der PV. Der Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Der Vergleich der Lokalisation zwischen wildtypischem mCherry-mGBP6 und der Mutante mGBP6-D542N (Abbildung 31) zeigt eine stark verringerte Kolokalisation zwischen Parasiten und der Asparaginsäure-Mutante. Bei manchen intrazellulären Parasiten kann eine Lokalisation des mCherry-mGBP6 an der PV beobachtet werden (Abbildung 31, untere Bildreihe, Pfeil), dennoch zeigt sich bei der Auswertung intrazellulärer Parasiten bezüglich ihrer Kolokalisation mit mCherry-mGBP6, dass es durch die Mutation zu einer Beeinträchtigung der Kolokalisation kommt.

Tabelle 4: Auswertung der Kolokalisation von mCherry-mGBP6 Konstrukten mit intrazellulären *T. gondii*. Es wurden jeweils 200 intrazelluläre Parasiten untersucht und der Prozentsatz derer bestimmt, die mit den mGBP6-Konstrukten kolokalisieren.

Konstrukt	% Kolokalisation
mCherry/mGBP6 WT	77
mCherry/mGBP6 D537N	60
mCherry/mGBP6 D542N	38
mCherry/mGBP6 E590D	50

Die Mutationsanalysen zeigen, dass Asparaginsäure 542 eine für die Translokation von mGBP6 wichtige Aminosäure ist. Wird diese zu Asparagin mutiert, wie es an der analogen Stelle im nicht-rekrutierendem mGBP10 vorliegt, ist die Translokation beeinträchtigt.

#### 4.2.5 Inhibition der Sekretion von Rhoptrien Proteinen mittels 4'-Bromophenacyl Bromid

Intrazelluläre Parasiten haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Immunabwehr des Wirtes zu entgehen, wie die Bildung der parasitophoren Vakuole bei *T. gondii* während der Invasion in die Wirtszelle (Joiner et al., 1994; Schwab et al., 1994). Aber schon vor und während des aktiven Eindringens in die Wirtszelle werden vom Parasiten verschiedene Effektormoleküle in die Wirtszelle sekretiert (Boothroyd und Dubremetz, 2008). Hierbei sind die sekretorischen Organellen, die Mikroneme, Rhoptrien und die Dichten Granula beteiligt. Die sekretierten Effektormoleküle unterscheiden sich je nach Pathogenität des *Toxoplasma*-Stammes (Behnke et al., 2011; Saeij et al., 2005; Taylor et al., 2006). So unterscheiden sich zum Beispiel virulente Typ I Stämme (BK, RH) vom intermediär virulenten Typ II Stamm (ME49) in ihren sekretierten ROP-Kinasen (Saeij et al., 2005; Taylor et al., 2006). Diese ROP-Kinasen beeinflussen je nach Pathogenität Signalwege innerhalb der Wirtszelle.

Die Rekrutierung der mGBPs um die PV von *T. gondii* ist ebenfalls abhängig von der Virulenz des Stammes. So haben virulente Stämme wie BK und RH Mechanismen entwickelt, um die Rekrutierung der mGBPs zu verhindern (Degrandi et al., 2007; Virreira Winter et al., 2011). Es könnte sein, dass auch hier die zur unterschiedlichen Virulenz beitragenden ROP-Kinasen wichtig sind und das unterschiedliche Rekrutierungsverhalten begründen. Um aufzuklären, ob die ROP-Kinasen für die Unterschiede in der Rekrutierung der mGBPs nach Infektion mit virulenten Typ I Stämmen (BK, RH) oder intermediär virulenten Typ II (ME49) verantwortlich sind, wurde die Sekretion der ROP-Kinasen durch den Inhibitor 4'-Bromophenacyl Bromid (4-BPB) gehemmt (Ravindran et al., 2009). Dies beeinträchtigt allerdings auch die Invasion der Parasiten in die Wirtszelle, daher wurde in den folgenden Versuchen die Infektionszeit auf 3 h erhöht. Ziel war es, herauszufinden, ob durch die Inhibition der ROP-Proteine in virulenten *T. gondii*-Stämmen, eine erhöhte Rekrutierung der mGBPs um die PV zu beobachten ist.

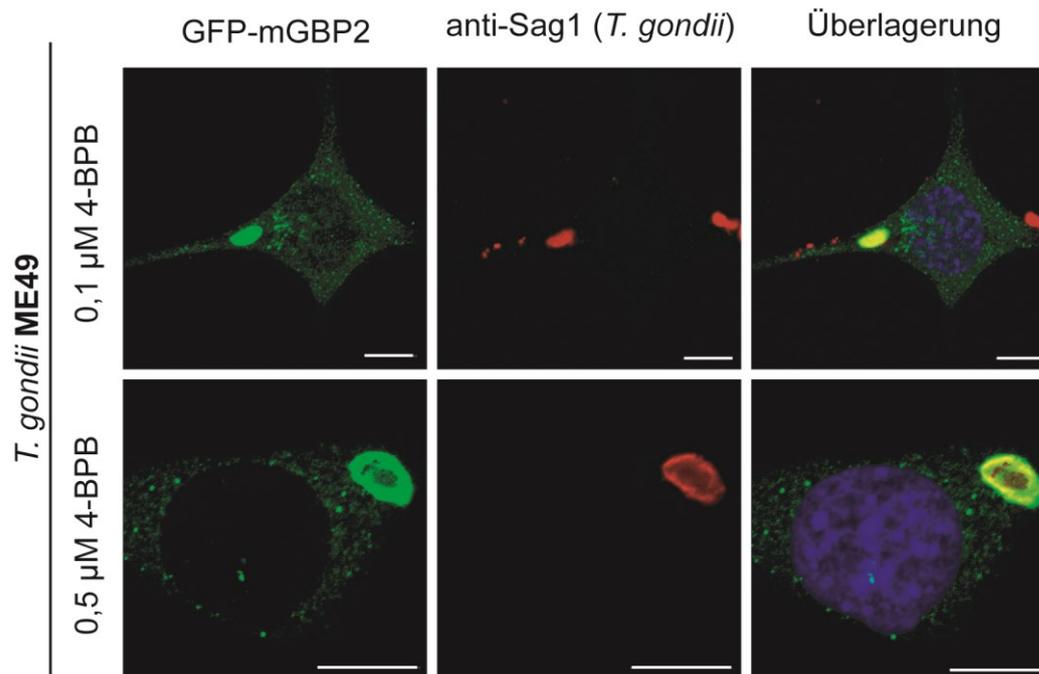


Abbildung 32: Einfluss von 4-BPB auf die mGBP2 Rekrutierung nach *T. gondii* ME49-Infektion. GFP-mGBP2-exprimierende MEFs wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert. Die Toxoplasmen wurden für 30 min vor Infektion mit 0,1  $\mu$ M oder 0,5  $\mu$ M des Inhibitors behandelt. Es folgte die Infektion der MEFs und die Analyse der Kolo-kalisation zwischen GFP-mGBP2 (grün) und intrazellulären Parasiten (rot). Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Im Versuch wurde der Inhibitor 4-BPB zunächst im Zusammenhang mit Typ II ME49 Toxoplasmen getestet. Die Parasiten wurden für 30 min mit entsprechenden Konzentrationen des Inhibitors 4-BPB prä-inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Infektion von GFP-mGBP2-exprimierenden MEFs, die zuvor über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert worden waren. Abbildung 32 zeigt, dass weder 0,1  $\mu$ M noch 0,5  $\mu$ M des Inhibitors Einfluss auf die mGBP2 Rekrutierung hat. Höhere Konzentrationen von 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M wurden ebenfalls getestet, allerdings verhindern diese hohen Konzentrationen das Eindringen der Parasiten in die Wirtszelle (nicht gezeigt). Die BK-Parasiten wurden parallel zu den ME49-Toxoplasmen 30 min vor Infektion mit dem Inhibitor 4-BPB prä-inkubiert und anschließend gewaschen. Die Parasiten für den Kontrollansatz wurden mit entsprechenden Mengen DMSO behandelt, da der Inhibitor in DMSO gelöst wurde.

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse dargestellt. Ohne 4-BPB, kommt es nach BK-Infektion zu keiner Rekrutierung von mGPB2 um die PV herum. Schon geringe Mengen Inhibitor (0,1  $\mu$ M) reichen aus, um die Menge an GFP-mGBP2-positiven Vakuolen zu erhöhen. Bei erhöhter Inhibitorkonzentration von 0,5  $\mu$ M steigt die Zahl der mGBP2-positiven intrazellulären Parasiten nicht weiter. Ab 1  $\mu$ M 4-BPB werden keine Zellen mehr infiziert. Das Eindringen in die Wirtszelle wird durch hohe Konzentrationen des Inhibitors verhindert, allerdings nicht die Anlagerung der Parasiten an die äußere Wirtszellmembran. Das konnte im Versuch wie von Ravindran (Ravindran et al., 2009) beschrieben beobachtet werden.

Die quantitative Auswertung des Versuches ist schwierig, da nur wenige Parasiten in die Zellen eindringen. Es wurden für die quantitative Auswertung pro Versuch 100

intrazelluläre Parasiten gezählt und bestimmt, ob die PV von GFP-mGBP2 umgeben, also GFP-mGBP2-positiv ist. Die Zahlen in Tabelle 4 zeigen die Mittelwerte von drei Versuchen.

**Tabelle 5 Einfluss des Inhibitors 4-BPB auf die Kolokalisation von mGBP2 nach ME49- und BK- *T. gondii* Infektion von MEFs. Für entsprechende Details siehe Text.**

	ohne Inhibitor	0,1 $\mu$ M 4-BPB	0,5 $\mu$ M 4-BPB
ME49	50,6%	40,3%	36,5%
BK	4,5%	12 %	12,5%

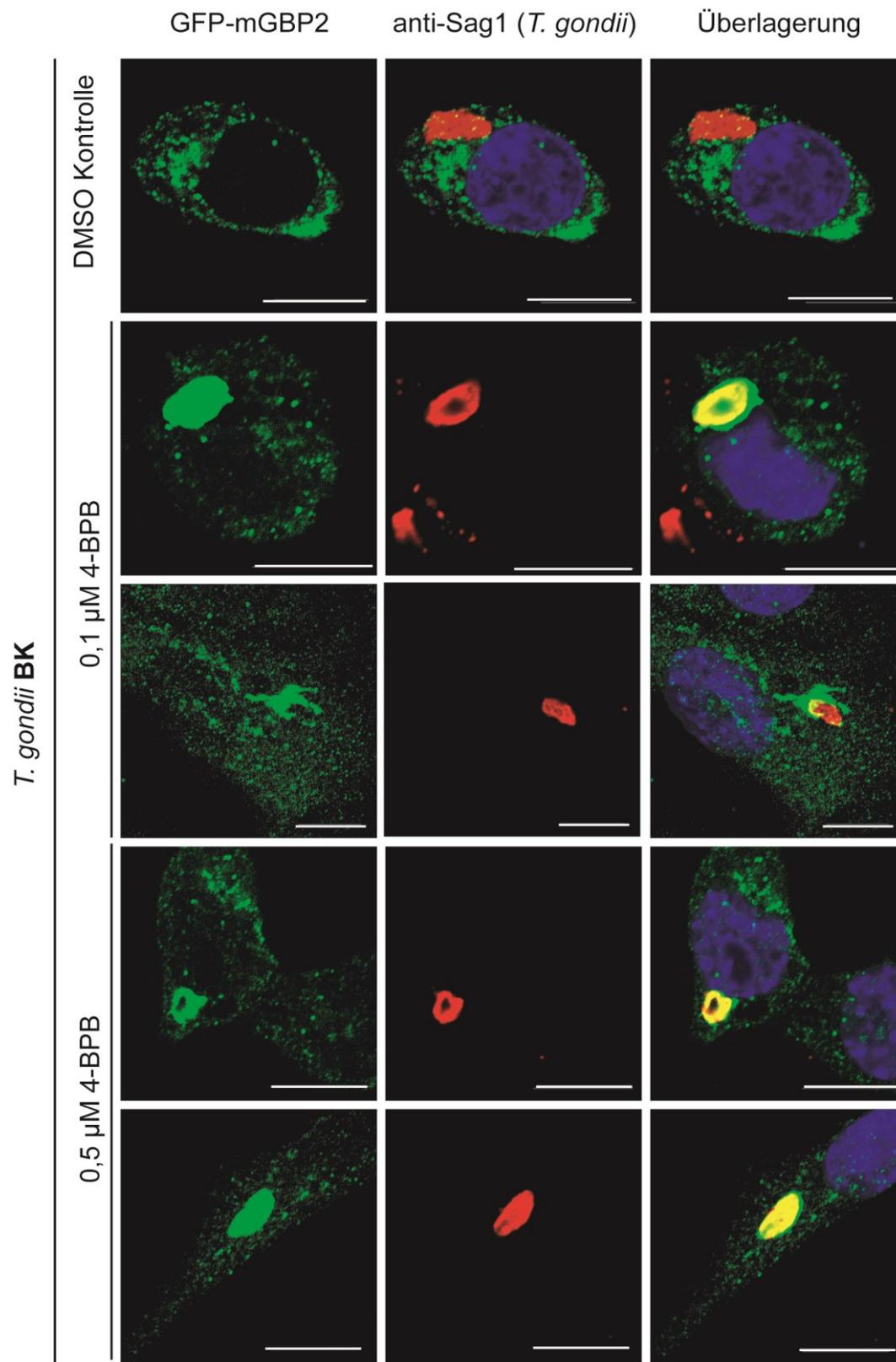


Abbildung 33: Einfluss des Inhibitors 4-BPB auf die Relokalisation von mGBP2 nach BK- *T. gondii* Infektion. GFP-mGBP2-exprimierende MEFs wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert. Die Toxoplasmen wurden für 30 min vor Infektion mit 0,1  $\mu$ M oder 0,5  $\mu$ M des Inhibitors behandelt und anschließend gewaschen. Es folgte die Infektion der MEFs und die Analyse der Kolokalisation zwischen GFP-mGBP2 (grün) und intrazellulären Parasiten (rot). Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Die Ergebnisse der Versuche mit dem ROP-Inhibitor 4-BPB zeigen, dass die Rekrutierung von mGBP2 nach Infektion mit Typ I BK-Toxoplasmen durch sezernierte ROP-Proteine verhindert wird. Durch die Inhibierung der ROP-Sezernierung kommt es zu einer erhöhten Translokation von mGBP2 an die PV.

#### **4.2.6 Selektive Permeabilisierung der parasitophoren Vakuolenmembran zur Topologiebestimmung von mGBP2**

Um die Funktionalität der mGBP-Rekrutierung um die PV herum näher charakterisieren zu können, ist es wichtig zu wissen, welche Topologie die mGBPs an der PV aufweisen. Wo genau die mGBPs anlagern oder mit der PVM interagieren, ob die mGBPs an der zytoplasmatischen Seite der PVM agieren, es eine Integration in die PVM gibt, oder ob die mGBPs sogar die PVM passieren und im Inneren der parasitophoren Vakuole wirken, sollte aufgeklärt werden.

Hierzu wurden daher selektive Permeabilisierungs-Versuche durchgeführt (Methoden, 3.2). Dazu wurde das Protokoll der Immunfluoreszenz Färbung dahingehend abgeändert, dass unterschiedliche Konzentrationen an Saponin zur Permeabilisierung von Membranen eingesetzt wurden. Bei geringen Konzentrationen (0 - 0,001%) Saponin soll lediglich die äußere Wirtszellmembran permeabilisiert und somit zugänglich für Antikörper werden (Beckers et al. 1994). Es kommt bereits durch die Fixierung mit PFA zu einer Permeabilisierung der äußeren Wirtszellmembran (Mc Carthy, 2007), daher können schon ohne Saponin Antikörper in die Zelle gelangen und Proteine detektieren. Wird die Saponinkonzentration erhöht (0,02 – 0,15 %) kommt es auch zu einer Permeabilisierung der parasitophoren Vakuolenmembran und der Exposition von parasitären Oberflächenproteinen, sodass Antikörper binden können (Beckers et al., 1994).

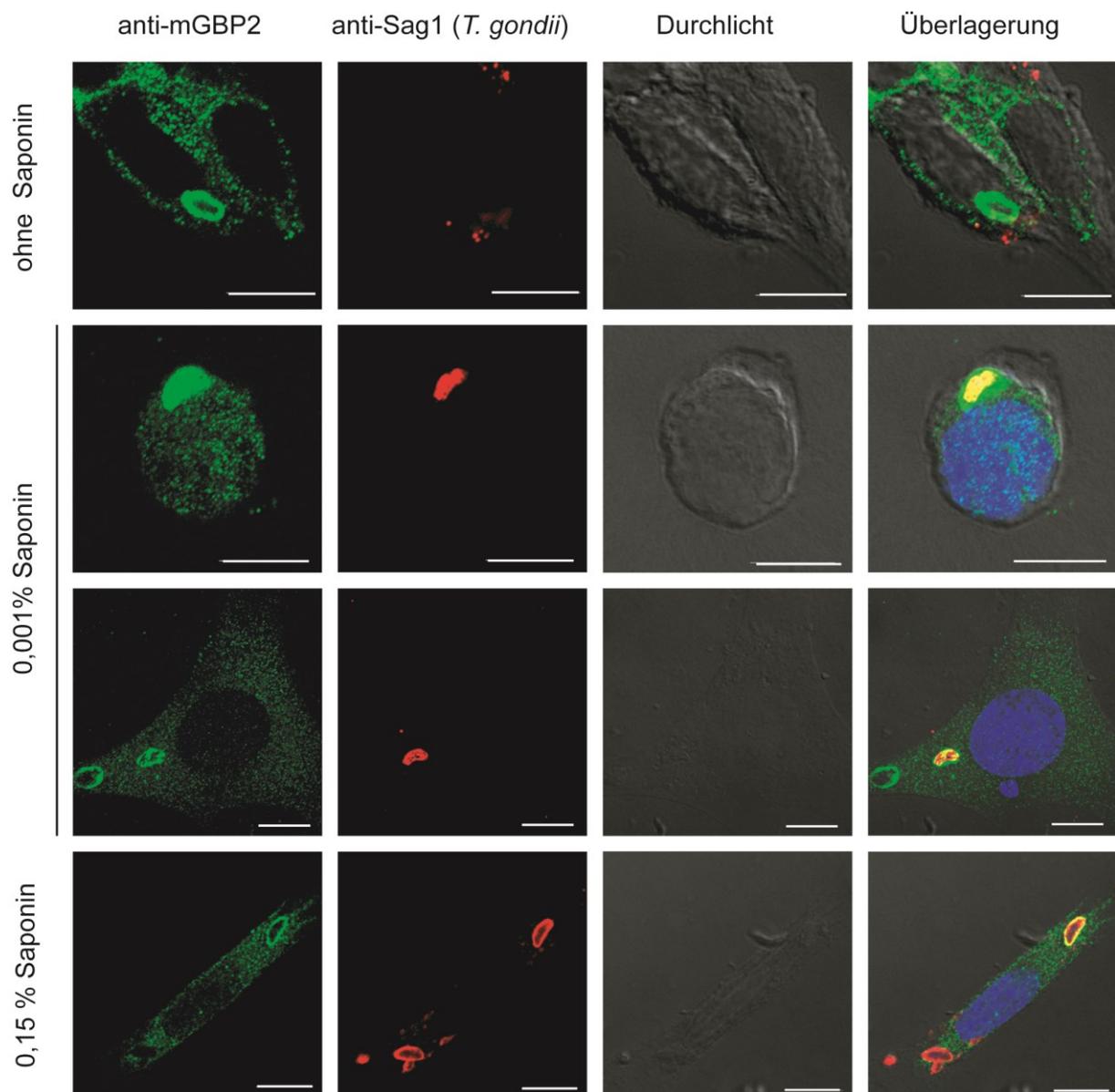


Abbildung 34: Selektive Permeabilisierung von murinen embryonalen Fibroblasten. Wildtyp MEFs wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag mit *T. gondii* (ME49) für 2 h infiziert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Der Versuch mit dem intermediär virulenten Typ II *T. gondii*-Stamm ME49 ist in Abbildung 34 gezeigt. Während des Versuchs ist aufgefallen, dass auch schon ohne Permeabilisierung mit Saponin, Signale der Antikörper gegen zytosolisches mGBP2 und selten gegen das *Toxoplasma*-Oberflächenprotein Sag1, zu detektieren waren. So zeigte sich, dass von 100 intrazellulären Toxoplasmen bereits 50 % positiv bezüglich eines mGBP2 Signals waren, 38 % der intrazellulären Parasiten waren positiv für mGBP2 und Sag1. Außerdem konnten 12 % intrazelluläre Parasiten als mGBP2-negativ, aber Sag1-positiv identifiziert werden. Die Verteilung mit der sehr geringen Saponinkonzentration von 0,001% war ähnlich wie die im Ansatz ohne Saponin. Mit einer Konzentration von 0,15% Saponin zeigt sich eine Verteilung, wie sie sich auch im Standardversuchsansatz zeigt. Zur Übersicht wurden die Werte in Tabelle 6 zusammengefasst.

Der gleiche Versuch wurde mit den virulenten Typ I *T. gondii*-Stamm BK durchgeführt.

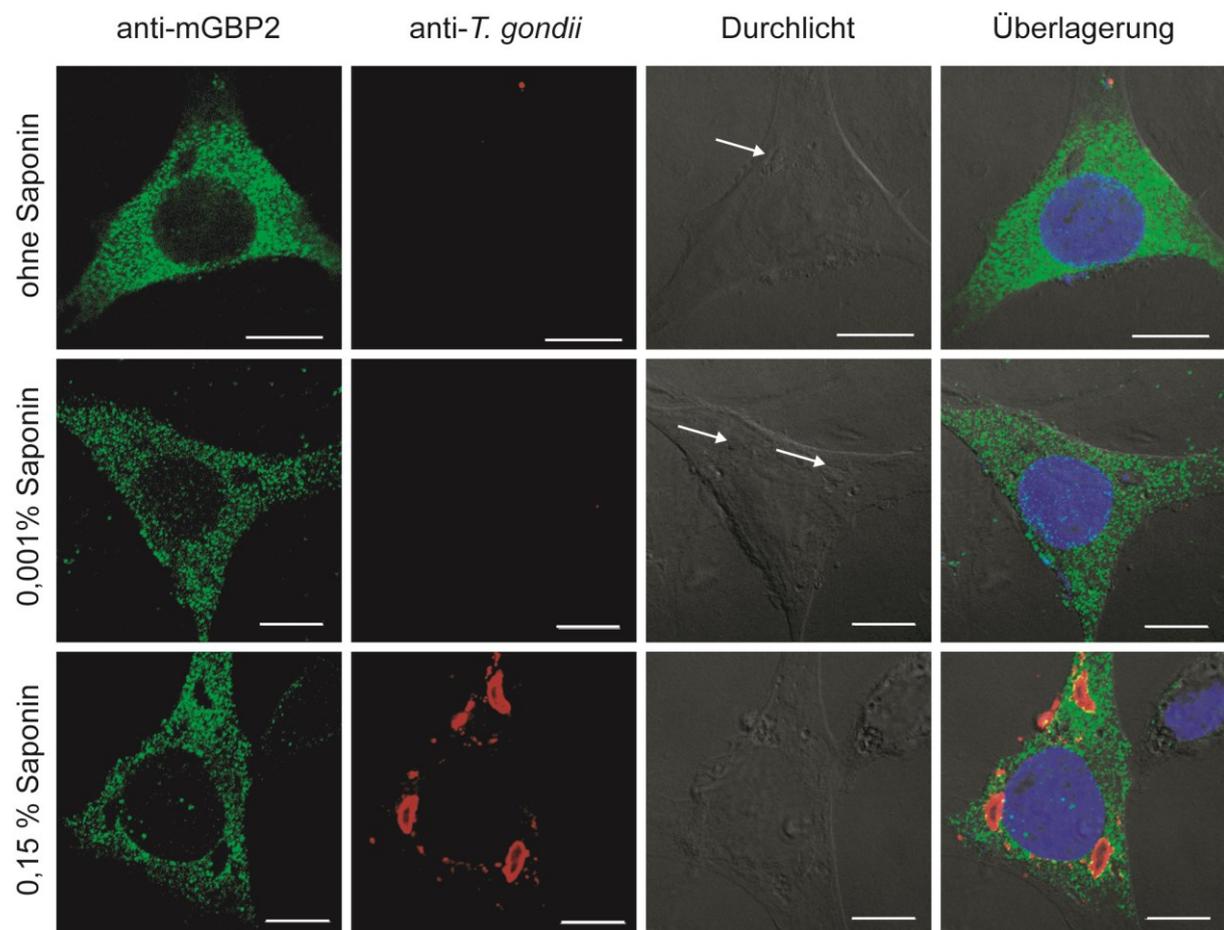


Abbildung 35: Selektive Permeabilisierung nach Infektion mit *T. gondii* Stamm BK; intrazelluläre ungefärbte Parasiten sind durch Pfeile markiert. Die WT MEFs wurden über Nacht IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für 2 h mit *T. gondii* infiziert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Nach Infektion mit BK-Toxoplasmen und einer Permeabilisierung ohne oder mit 0,001 % Saponin konnte eine vesikuläre mGBP2-Verteilung in der Wirtszelle beobachtet werden. Es konnten nur sehr wenige Sag1-positive BK-Parasiten detektiert werden (3 % bzw. 30 %, siehe Abbildung 35 und Tabelle 6). Ähnliches zeigte sich mit einer höheren Saponinkonzentration (0,15 %). Auch hier wurde, den Erwartungen entsprechend, ein sehr geringer Anteil an Kolokalisation von mGBP2 mit den virulenten Parasiten beobachtet (1 %), aber die Saponinkonzentration reichte aus, um die PVM zu permeabilisieren, wodurch nahezu alle intrazellulären Parasiten vom Antikörper detektiert wurden (99 %).

Tabelle 6 Auswertung selektive Permeabilisierung; \*=Differenz zu 100 % entsprechen ungefärbte, intrazelluläre Parasiten; n.d. nicht determinierbar.

	ME49 <i>T. gondii</i>			BK <i>T. gondii</i>		
	mGBP2+ Sag1-	mGBP2+ Sag1+	mGBP2- Sag1+	mGBP2+ Sag1-	mGBP2+ Sag1+	mGBP2- Sag1+
ohne Saponin	50 %	38 %	12 %	n.d.	n.d.	3 %
0,001 % Saponin	64 %*	22 %*	10 %*	n.d.	n.d.	30 %
0,15 % Saponin	n.d.	57 %	43%	n.d.	1 %	99 %

So zeigt sich in diesem Versuch, dass nach Infektion mit ME49-Toxoplasmen schon ohne bzw. mit wenig Saponin auch Sag1-positive parasitophore Vakuolen detektiert werden können. Dies ist nach Infektion mit BK-Toxoplasmen nicht der Fall, hier können ohne ausreichende Saponinkonzentrationen kaum Sag1-positive Vakuolen detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mGBPs wahrscheinlich an der zytoplasmatischen Seite der PVM anlagern. Außerdem können nach Infektion mit ME49-*T. gondii* auch ohne Permeabilisierung Parasiten mittels oberflächenproteinspezifischen Antikörper (anti-Sag1) von *T. gondii* detektiert werden. Dies ist nicht der Fall nach einer Infektion mit virulenten Typ I BK-Toxoplasmen. Es kann somit postuliert werden, dass die Anlagerung von mGBP2 an die PVM zu einer Permeabilisierung der PV Membran führt.

#### 4.2.7 Abhängigkeit der Translokation zur *T. gondii* PV von mGBP2 und p62/SQSTM1

Bereits im Abschnitt 4.1.2 wurde die Kolokalisation von mGBP2 und p62/SQSTM1 beschrieben. Diese Kolokalisation sollte im Folgenden funktionell genauer beschrieben werden. Dazu wurde in einer Kinetik überprüft, ob die Kolokalisation von mGBP2 und p62/SQSTM1 an der parasitophoren Vakuole zeitgleich erfolgt und somit Rückschlüsse auf eine funktionelle Abhängigkeit der Proteine gezogen werden können (Abbildung 36). Dazu wurden GFP-mGBP2 exprimierende MEFs wie im vorherigen Ansatz IFN $\gamma$  stimuliert und mit *T. gondii* infiziert. Die Fixierung und Fluoreszenzfärbung erfolgte allerdings in einer Kinetik. Der erste Zeitpunkt für die Färbung wurde auf fünf Minuten nach Infektion festgelegt, es folgten 10, 15, 20, 30 und 60 min nach Infektion. Bereits fünf Minuten nach Infektion konnte man in wenigen Zellen erste mGBP2-positive PVs detektieren (nicht gezeigt). Zehn Minuten nach Infektion stieg der Anteil der GFP-mGBP2-positiven parasitophoren Vakuolen deutlich. Ein punktuell p62/SQSTM1 Signal wurde allerdings erst nach ca. 15 min an der PV detektiert (Pfeil), welches auch

mit GFP-mGBP2 kolokalisierte. Ein deutliches, mit mGBP2 kolocalisierendes p62/SQSTM1-Signal um die gesamte Vakuole konnte nach 20 min beobachtet werden (Abbildung 36).

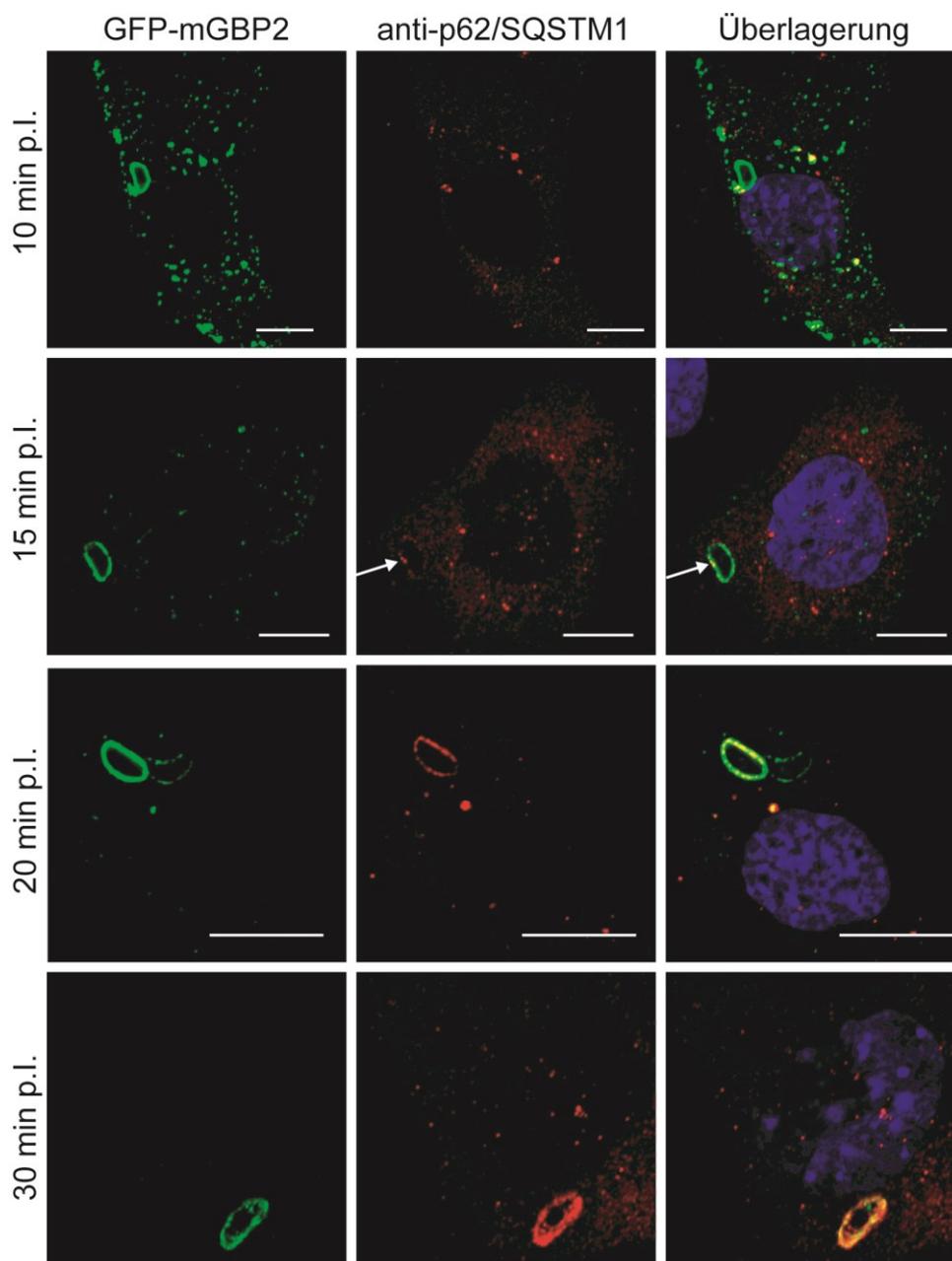


Abbildung 36: Kinetik der Kolokalisation von GFP-mGBP2 (grün) und p62 (rot) an der PV intrazellulärer Parasiten. Erste kolocalisierende GFP-mGBP2/p62-Signale wurden nach 15 min beobachtet und mit Pfeilen markiert. Die Maßstabsbalken zeigen eine Einheit von 10  $\mu\text{m}$ .

Aufgrund der Kolokalisationsergebnisse aus dem allgemeinen Versuchsaufbau (Abbildung 6) und der Kinetik folgte die Fragestellung, ob die Lokalisation an der parasitophoren Vakuolenmembran von p62/SQSTM1 etwa mGBP2-abhängig ist oder eventuell eine Abhängigkeit der mGBP-Lokalisation von p62/SQSTM1 besteht. Um dies

weiter aufzuklären, wurden Lokalisationsstudien in mGBP2-defiziente Zellen, als auch in p6/SQSTM12 „knock down“ Zellen durchgeführt.

Dazu war es zunächst notwendig, die p62/SQSTM1 Expression auszuschalten bzw. herunter zu regulieren. Dies wurde in dieser Arbeit mittels kleinen interferierenden RNA-Molekülen (*small interfering RNA*, siRNA) erreicht (Elbashir et al., 2001). Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die im Rahmen der RNA-Interferenz in Zellen die Genexpression regulieren können. Der Prozess der RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus in Eukaryoten. Durch die Wechselwirkung mit komplementären kurzen RNA-Sequenzen kommt zum Abbau kodierender mRNA und somit wird die Genexpression des Zielproteins herunter-reguliert (*Silencing*, „*knock down*“).

Für den Versuch wurde ein Vektor mit entsprechender Zielsequenz oder mit einer zufälligen Sequenz („*scrambled*“) als Kontrolle in NIH3T3-Fibroblasten und GFP-mGBP2-exprimierende MEFs stabil eingebracht. Die stabil exprimierenden Klone wurden mittels Puromycin-Resistenz vermehrt und auf einen Gen-„knock down“ mittels qRT-PCR getestet (nicht gezeigt). Mögliche „knock-down“-Klone wurden herangezogen und die Proteinexpression mittels Western Blot-Verfahren überprüft (Abbildung 37).



Abbildung 37: Western Blot. p62/SQSTM1 knock down in GFP-mGBP2-exprimierenden MEFs. Zelllysate verschiedener Klone wurde auf p62/SQSTM1-Expression analysiert. Dies wurde mit anti-p62/SQSTM1 oder anti- $\beta$ -Aktin durchgeführt. Als Kontrolle diente eine siRNA mit zufälliger Sequenz (*scrambled*) und als Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin.

Solchermaßen verifizierte „knock-down“-Zellen wurden für Kolokalisationsstudien mittels konfokaler Mikroskopie eingesetzt. Hierzu wurden wie bereits beschrieben die Zellen über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und danach mit *T. gondii* für 2 h infiziert (Abbildung 38).

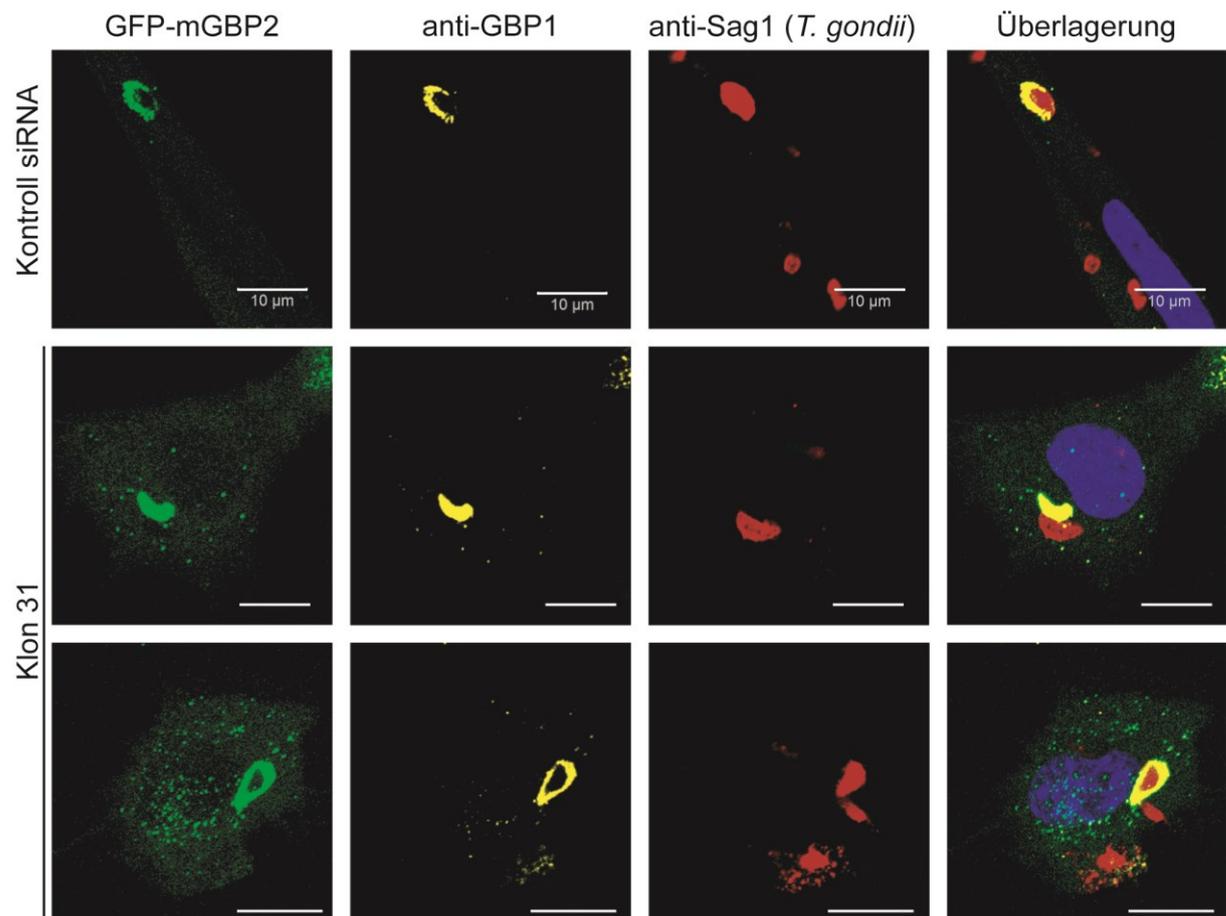


Abbildung 38: p62 „knock down“ in GFP-mGBP2-exprimierenden MEFs. Im Versuch wurde der verifizierte knock down Klon 31 verwendet und ein Klon transfiziert mit Kontroll siRNA. Es wurde die Lokalisation von GFP-mGBP2 (grün), mGBP1 (gelb) nach IFN $\gamma$ -Stimulation über Nacht und *T. gondii* Infektion für 2 h analysiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

In den verifizierten p62/SQSTM1 herunter-regulierten Zellen konnte weder von mGBP2 noch von mGBP1 eine deregulierte Lokalisation beobachtet werden. Eine p62/SQSTM1-Kontrollfärbung war in diesem Ansatz aufgrund der gleichen Sekundärantikörperspezifität mit dem anti-Sag1 Toxoplasmenantikörper nicht möglich, wurde aber in anderen Versuchen überprüft (nicht gezeigt). Daraus lässt sich folgern, dass die beobachtete Kollokalisierung von p62/SQSTM1 und mGBP2 keinen Einfluss auf die Lokalisationsänderung der mGBPs nach *T. gondii* Infektion hat. Allerdings könnte es sein, dass eine umgekehrte Abhängigkeit der Lokalisation vorliegt, also die Lokalisation von p62/SQSTM1 an der PVM abhängig von mGBP2 ist. Daher wurden Kollokalisationsstudien mit p62/SQSTM1 und *T. gondii* in mGBP2 defizienten Zellen durchgeführt.

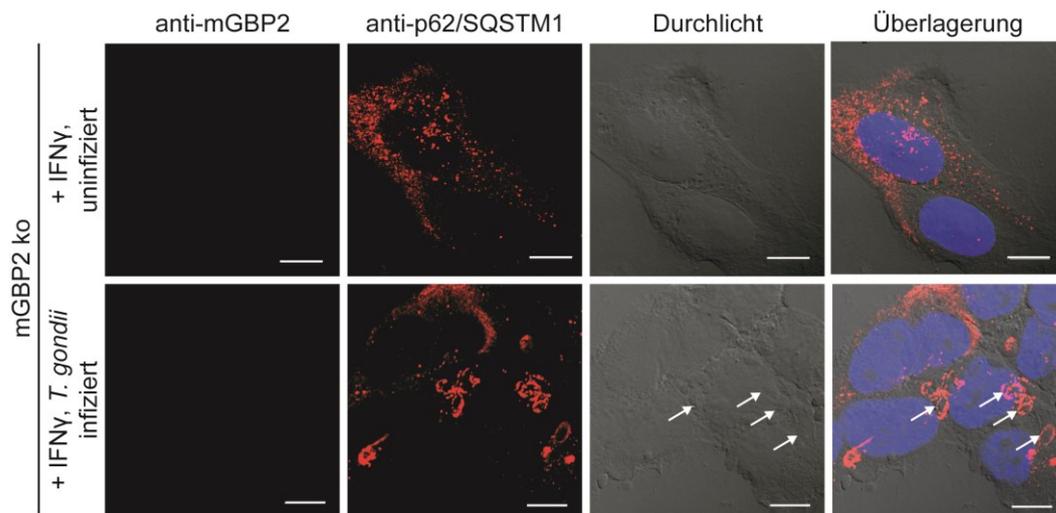


Abbildung 39: p62-Lokalisation in mGBP2 defizienten MEFs nach IFN $\gamma$ -Stimulation über Nacht und *T. gondii* Infektion für 2 h. Nach Infektion sind die intrazellulären Parasiten im Durchlicht nur schwer zu erkennen (Pfeile). Die Färbung mit dem anti-mGBP2 Antikörper diente zur Kontrolle, es konnte kein Signal detektiert werden (erste Spalte). Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Der Versuch zeigt, dass die Lokalisation von p62/SQSTM1 in mGBP2-defizienten Fibroblasten nicht beeinträchtigt ist. Die intrazellulären Parasiten sind nach Infektion nur schwer im Durchlicht zu erkennen und wurden daher mit Pfeilen markiert (Abbildung 39). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nach IFN $\gamma$ -Stimulation zu kolokalisierenden Vesikeln kommt, die positiv für mGBP2 und p62/SQSTM1 sind. Auch nach *T. gondii* Infektion kommt es zu einer Kolokalisation an der parasitophoren Vakuolenmembran. Allerdings scheint die Rekrutierung von mGBP2 und p62/SQSTM1 voneinander unabhängig zu sein. Denn in mGBP2 defizienten Zellen kommt es zu einer Kolokalisation von p62/SQSTM1 mit dem intrazellulären Parasiten und auch in p62/SQSTM1 „knock-down“ Zellen zeigt sich eine Kolokalisation von mGBP2 und mGBP1 mit der PVM.

## 4.3 mGBPs im Zusammenhang mit Autophagie

### 4.3.1 ATG5-Abhängigkeit der mGBP2 Kolokalisation

Eine Verbindung zwischen mGBPs und Autophagie zeigt sich schon in den Experimenten mit p62/SQSTM1, einem für die Autophagie wichtigen Adapterprotein (Pankiv et al., 2007). Es ist beschrieben, dass Autophagie nicht nur eine Rolle spielt, um Nährstoffmangel zu überbrücken, indem Zellkompartimente „selbstverdaut“ werden (Alberts B, 2002), sondern auch einen wichtigen Mechanismus für die Abwehr intrazellulärer Pathogene darstellt (Deretic et al., 2009). Weiterhin wurde für andere IFN $\gamma$ -induzierte GTPasen, den IRGs (*immune related GTPases*), beschrieben, dass die Kolokalisation mit intrazellulären Parasiten eine ATG5-Abhängigkeit aufweist (Zhao et

al., 2008). Das Protein ATG5 (*Autophagie Protein 5*) ist wichtig für die Elongation der Membranen von Autophagosomen (Youle und Narendra, 2011).

Zur Untersuchung ob das Autophagieprotein ATG5 wichtig für die Rekrutierung von mGBP2 an die PV ist, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit ATG5-defizienten MEFs durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für 2 h mit *T. gondii* infiziert. Es wurde mittels Antikörper endogenes mGBP2 gefärbt und die Parasiten mit Hilfe des Oberflächenmarkers Sag1 detektiert (Abbildung 40).

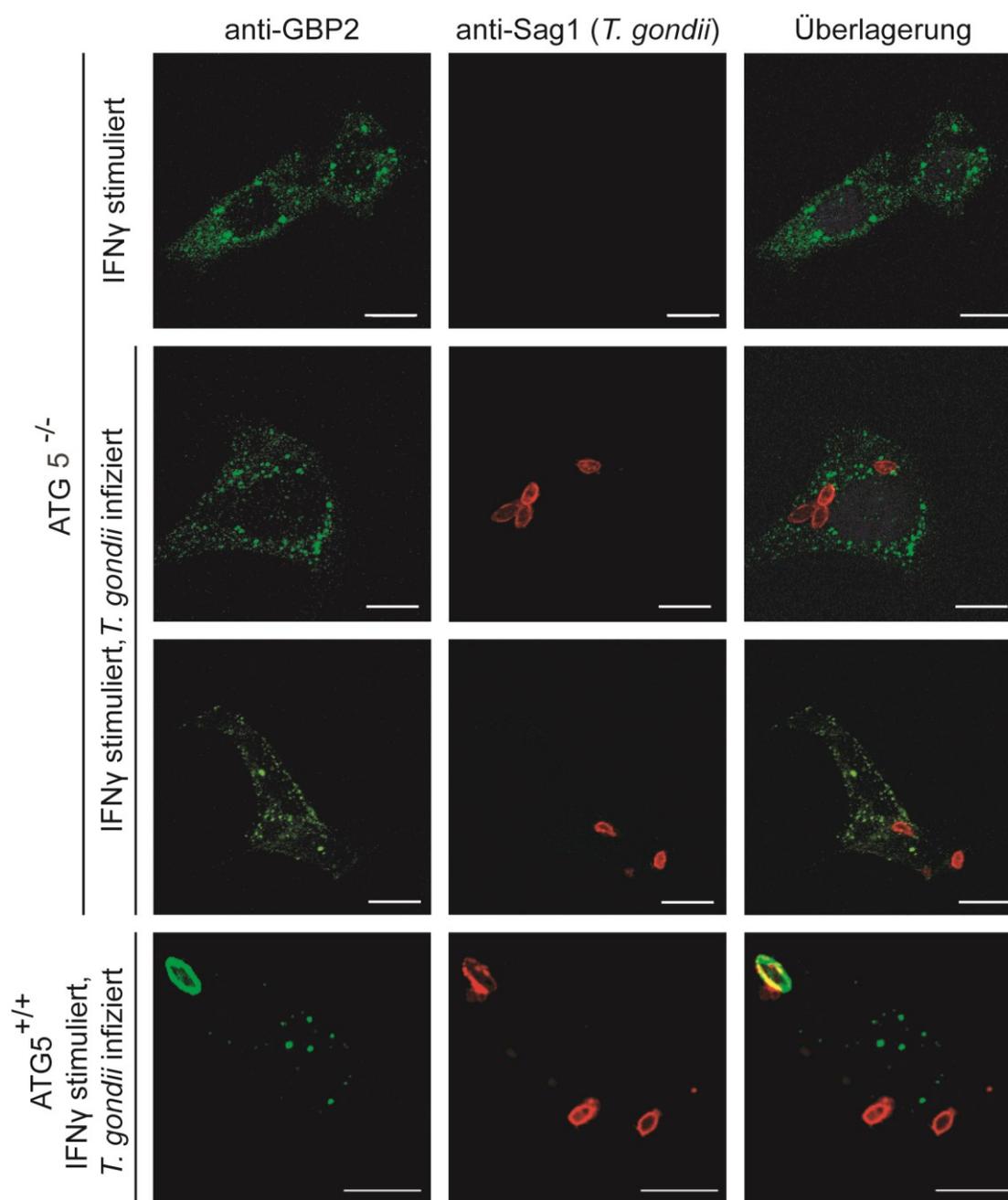


Abbildung 40: mGBP2-Lokalisation in ATG5<sup>-/-</sup> und ATG5<sup>+/+</sup> MEFs. Die Zellen wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag mit ME49-*T. gondii* infiziert. Die Kolokalisation zwischen mGBP2 (grün) und intrazellulären Toxoplasmen (rot) wurde analysiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m.

Im Vergleich zu wildtypischen ATG5-MEFs (Abbildung 40, Bildreihe 4), in denen bei ca. 60 % der intrazellulären Parasiten ein mGBP2-positives Signal an der PV zu detektieren ist, zeigte sich in ATG5-defizienten MEFs (Abbildung 40, Bildreihe 1-3) eine deutlich verringerte Kolokalisation bei nur ca. 6 % der intrazellulären Parasiten. In diesem Versuch wurde endogenes Protein mit einem mGBP2-spezifischem Antikörper gefärbt. Es wurden ATG5<sup>+/+</sup> und ATG5<sup>-/-</sup> Zellen mit einem GFP-mGBP2-exprimierenden Vektor stabil transduziert. Diese Zellen wurden dann für Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt. Dazu wurden sie über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für 2 h mit *T. gondii* infiziert. Die Versuche mit diesen GFP-mGBP2 überexprimierenden ATG5-defizienten MEFs zeigten eine ähnliche Tendenz wie in den Versuchen mit dem anti-mGBP2 Antikörper. Sie zeigten eine verringerte Kolokalisation von mGBP2 mit intrazellulären Toxoplasmen in den ATG5-defizienten im Vergleich zu den ATG5 wildtypischen Fibroblasten. In ATG5<sup>+/+</sup> MEFs zeigte sich eine Kolokalisation von GFP-mGBP2 mit der PV bei ca. 50% der intrazellulären Parasiten. Im Vergleich dazu konnte in den GFP-mGBP2-exprimierenden ATG5<sup>-/-</sup> MEFs nur eine Kolokalisation von GFP-mGBP2 und Sag1 bei 30 % der intrazellulären Parasiten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kolokalisation von mGBP2 mit intrazellulären Toxoplasmen in ATG5-defizienten Fibroblasten (ATG5<sup>-/-</sup> MEFs) beeinträchtigt ist (Abbildung 40). Durch die ATG5-Abhängigkeit der Kolokalisation von mGBP2 mit dem Parasiten kam die Fragestellung auf, ob die Rekrutierung der mGBPs vom Prozess der Autophagie abhängig ist. Um dies zu klären, wurden im folgenden Versuch verschiedene Autophagie-Inhibitoren eingesetzt (Abbildung 41), um eine Abhängigkeit der Kolokalisation von Autophagie-Prozessen nachzuweisen.

Autophagie kann durch unterschiedliche Inhibitoren gehemmt werden. So können 3-Methyladenin (3-MA) oder Wortmannin (WM) eingesetzt werden (Blommaert et al., 1997; Powis et al., 1994; Vlahos et al., 1994). Sie hemmen Phosphoinositid-3 Kinasen (PI3K) des Types III (Knight und Shokat, 2007; Kong und Yamori, 2008) und blocken Autophagie dadurch, dass sie die Produktion von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) durch die Typ III PI3K verhindern (Petiot et al., 2000). Vinblastin (VIN) induziert die Akkumulation von autophagischen Vesikeln, aber der Abbau dieser Vesikel durch Verschmelzung mit dem Lysosom wird verhindert und somit Autophagie inhibiert (Gordon und Seglen, 1988; Hoyvik et al., 1986; Munafo und Colombo, 2001).

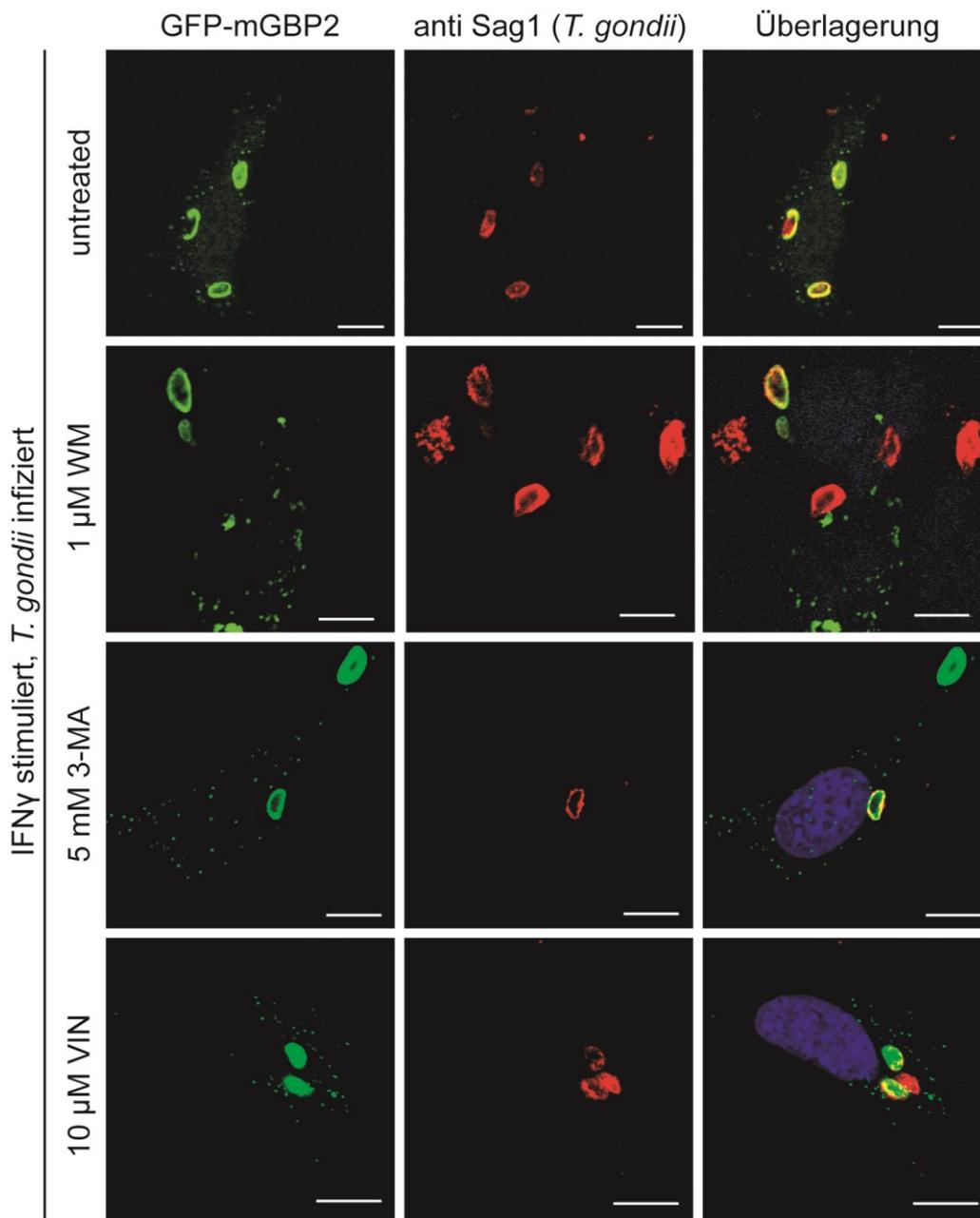


Abbildung 41: Einfluss verschiedener Autophagie-Inhibitoren auf die GFP-mGBP2-Kolokalisation mit *T. gondii* in wildtypischen MEFs; in der ersten Spalte ist das GFP-mGBP2-Signal abgebildet, in der zweiten Spalte *T. gondii* markiert mittels anti-Sag1-Antikörpern und in der letzten Spalte die Überlagerung der Signale. In der ersten Zeile ist die unbehandelte Kontrolle gezeigt, Zeile zwei zeigt Wortmannin (WM), in der dritten Zeile sind die 3-Methyladenin (3-MA) und in der letzten Zeile Vinblastin (VIN) behandelte Zellen; die Maßstabsbalken entsprechen 10 $\mu$ m

Im Versuch wurden GFP-mGBP2-exprimierende MEFs über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert und am nächsten Tag für 30 min mit den in der Literatur etablierten Konzentrationen der Inhibitoren vor-inkubiert (Blommaart et al., 1997; Munafo und Colombo, 2001; Seglen und Gordon, 1982). Dann erfolgte die Infektion mit *T. gondii* für 2 h. Anschließend fand die Fluoreszenzfärbung wie beschrieben statt (Methoden 3.1.5). Die Analyse wurde am konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

Unterschiedliche Konzentrationen der Inhibitoren wurden getestet. Für Wortmannin (WM) wurde 50 nM und 1 µM eingesetzt. Ein Unterschied konnte am Mikroskop nicht festgestellt werden, in beiden Fällen kam es zu leicht verringerten Frequenzen von ca. 40 % Kolokalisation zwischen mGBP2 und *T. gondii*, im Kontrollansatz ohne Inhibitor konnte eine Kolokalisationsrate von 56 % der intrazellulären Toxoplasmen festgestellt werden. Auch die Inkubation mit 3-Methyladenin (3-MA) oder Vinblastin (Vin) hatte keinen Einfluss auf die Rekrutierung von mGBP2 zur parasitophoren Vakuole.

Abschließend lässt sich sagen, dass die mGBP2-Rekrutierung ATG5-abhängig zu sein scheint, allerdings unabhängig von der Inhibition der Autophagie mittels chemischer Modulatoren.

### 4.3.2 Basale LC3 Level in mGBP2 defizienten MEFs

Für humanes GBP1 und GBP2 wurde beschrieben, dass Fibroblasten mit einem „*knock-down*“ für hGBP1/hGBP2 veränderte Autophagielevel, gemessen mittels LC3 und p62/SQSTM1 aufweisen (Al-Zeer et al., 2013). Aufgrund dieser Beobachtung und der Ergebnisse, die einen Zusammenhang zwischen mGBP2 und den für die Autophagie wichtigen Proteinen p62/SQSTM1 und ATG5 zeigen, wurde im Folgenden analysiert, ob es in mGBP2-defizienten Fibroblasten zu veränderten Autophagiedynamiken kommt. Somit können Rückschlüsse gezogen werden, ob mGBP2 einen Einfluss auf den Prozess der Autophagie-vermittelten Abwehr von intrazellulären Parasiten hat.

Für diesen Versuch wurden primäre wildtypische oder mGBP2-defiziente MEFs verwendet. Diese wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert oder als nicht stimulierte Kontrollen mitgeführt. Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen über Nacht unter „Hunger“-Bedingungen (Mangelmedium HBSS) gehalten, um Autophagie zu induzieren (Li et al., 2013). Das Medium hält den pH und die osmotische Balance aufrecht, enthält aber keine Nährstoffe außer essentiellen anorganischen Ionen. Anfänglich wurde eine HBSS-Inkubation von 4 h getestet, nach der in den mGBP2-MEFs keine Induktion von Autophagie zu erkennen war, daher wurde die Inkubationszeit auf 10 h ausgeweitet. Als Marker für Autophagie wurde LC3 eingesetzt, dies gilt als verlässlicher Autophagosomenmarker (Mizushima und Yoshimori, 2007). Während der Autophagie reift LC3-I zu LC3-II, daher stellt die Umsetzung von LC3-I zu LC3-II einen Marker für die Aktivität der autophagischen Proteolyse dar. Dabei korreliert die Menge an LC3-II mit der Anzahl der Autophagosomen. Die Halbwertszeit von LC3-II ist sehr kurz, da es während der Autophagie im Autophagolysosom abgebaut wird (Mizushima und Yoshimori, 2007). Um dennoch die Aktivität der autophagischen Proteolyse ermitteln zu können, wird der Inhibitor Bafilomycin A1 eingesetzt (Yamamoto et al., 1998). Dieser verhindert die Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom und somit die Bildung des Autophagolysosoms (Yamamoto et al., 1998). Durch die Inhibition der Fusion zwischen Autophagosom und Lysosom kommt es zu einer Anreicherung der Autophagosomen und somit zu einer Anreicherung von LC3-II und die Umsetzung zwischen LC3-I zu LC3-II kann verfolgt

werden. Die Umsetzung des Proteins kann durch die unterschiedlichen Größen verfolgt werden, LC3-I zeigt eine Bande bei 18 kDa und LC3-II ist bei 16 kDa zu detektieren (Mizushima und Yoshimori, 2007).

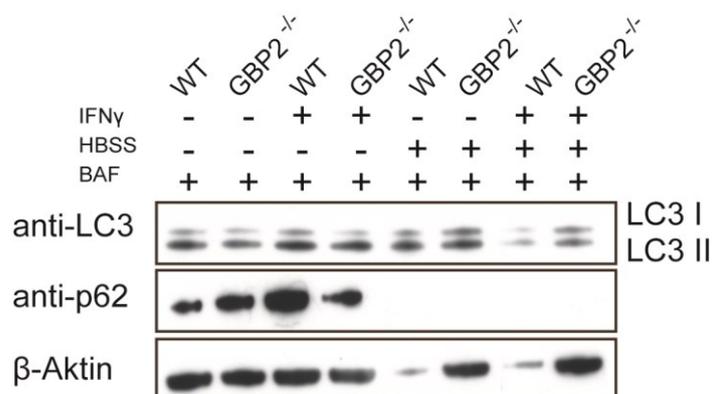


Abbildung 42: Western Blot-Analyse von LC3 und p62/SQSTM1 in primären WT und mGBP2-defizienten MEFs. Es werden die Blots eines Experiments gezeigt, exemplarisch von n=3 Experimenten. Im oberen Abschnitt wurde der Blot mit einem anti-LC3 Antikörper und mit einem anti-p62/SQSTM1 Antikörper inkubiert (mittig), gestrippt und die Proteinmengen mit einem anti- $\beta$ -Aktin Antikörper (unterer Abschnitt) kontrolliert.

Abbildung 42 zeigt die Induktion der Autophagie in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden über Nacht mit IFN $\gamma$  stimuliert oder nicht behandelt. Autophagie wurde induziert, indem die Zellen über Nacht im Mangelmedium (HBSS) inkubiert wurden. Um die Umsetzung von LC3-I zu LC3-II verfolgen zu können, wurde den Kulturmedien Bafilomycin A1 zugesetzt. Die Induktion der Autophagie lässt sich zusätzlich durch den Abbau des Adapterproteins p62/SQSTM1 verfolgen (Germain et al., 2011; Mizushima und Yoshimori, 2007). In Abbildung 42 zeigt sich, dass die p62/SQSTM1-Proteinlevel mit Induktion der Autophagie abnehmen.

Um feststellen zu können, ob die Induktion der Autophagie in den mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs beeinträchtigt ist, wurde die Umsetzung von LC3-I zu LC3-II verfolgt. Um Abweichungen der Proteinmengen auszugleichen (s.  $\beta$ -Aktin Kontrolle, Abbildung 42), wurden die Bandenintensitäten des in Abbildung 42 gezeigten Blots mit Hilfe des Programms ImageStudio Lite (LI-COR) ausgewertet. Dazu wurden die jeweiligen Bandenintensitäten des LC3-II Signals sowie der  $\beta$ -Aktin-Ladekontrolle mit Hilfe des Programms (LI-COR) bestimmt. Die Werte des LC3-II Signals wurden mit Hilfe der entsprechenden  $\beta$ -Aktin-Ladekontrolle normiert. Dazu wurden die Bandenintensitäten der LC3-II Werte durch die entsprechenden Intensitäten der Ladekontrolle dividiert. Die sich daraus ergebenden Zahlenwerte zeigen den steigenden Anteil an LC3-II, bedingt durch die Induktion der Autophagie. Dementsprechend bedeuten steigende Zahlenwerte, eine erhöhte Induktion der Autophagie.

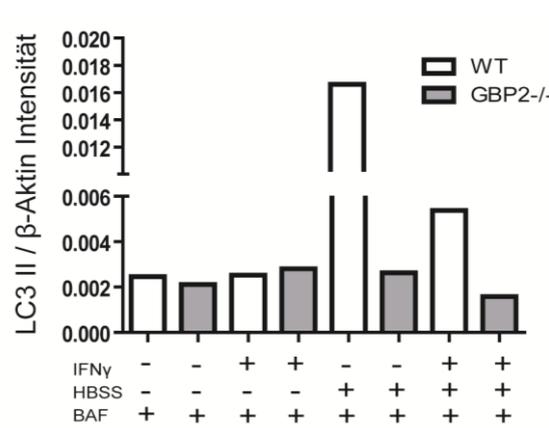


Abbildung 43: Darstellung der relativen LC3-II Bandenintensitäten in Korrelation zu der  $\beta$ -Aktin-Ladekontrolle. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe des Programms ImageStudio (LI-COR) ausgewertet und mit den entsprechenden  $\beta$ -Aktin-Ladekontrollen normiert.

In Abbildung 43 zeigt sich, der relative Anstieg von LC3-II im Autophagie-induziertem Zustand (WT, +HBSS, +BAF). Wird Autophagie nicht induziert, zeigen sich keine Unterschiede zwischen WT und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, unabhängig von der IFN $\gamma$  Stimulation (Abbildung 43; ersten vier Balken). Während der Autophagie-Induktion (+HBSS; letzte 4 Balken) zeigt sich ein verringertes Level an Autophagie in den mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs (Abbildung 43; mGBP2<sup>-/-</sup> +HBSS, -IFN $\gamma$  und +HBSS, +IFN $\gamma$ ). Im IFN $\gamma$ -stimulierten Zustand, unter „Hunger“-Bedingungen (+HBSS) ist das Level an LC3-II in den mGBP2-defizienten MEFs im Vergleich zum nicht stimulierten, Nährstoff-depletierten Zustand (+HBSS) geringer. Dieser Unterschied ist auch in den WT MEFs zu verfolgen.

Abschließend lässt sich sagen, dass in mGBP2-defizienten MEFs die autophagische, proteolytische Aktivität schon im nicht IFN $\gamma$ -stimulierten Zustand beeinträchtigt ist.

## 4.4 Die Rolle von mGBP2 im Infektionsmodell

### 4.4.1 Cytomegalovirus Infektion und mGBP2-Defizienz

Um die Rolle von mGBP2 in einem viralen Infektionsmodell zu untersuchen, wurden mGBP2-defiziente Mäuse (mGBP2<sup>-/-</sup>) und wildtypische Kontroll-Mäuse mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) infiziert. Beim für diese Experimente eingesetzten Virus ist der Genlocus des m157 Proteins durch das offene Leseraster für Luciferase (*luc*) ersetzt (MCMVΔm157:*luc*) (Trilling et al., 2011). Die Expression des m157 Genlokus steht unter dem immediate-early (IE) Promoter und findet in der frühen Phase der Genexpression statt. Der m157 Genlokus kodiert ein Oberflächenprotein, was mit dem Ly49H Rezeptor auf NK-Zellen interagiert (Bukowski et al., 1984; Welsh et al., 1984; Welsh et al., 1991). Das Enzym Luciferase kann das Substrat Luciferin umsetzen, während der Reaktion kommt es zur Biolumineszenz, die gemessen werden kann. Werden Zellen mit dem Luciferase-exprimierenden Virus infiziert, kommt es zu einer von der Viruslast abhängigen Umsetzung des Substrats, also zu einer viruslastabhängigen Biolumineszenz (Brasier et al., 1989).

Zuerst wurde die Suszeptibilität von mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen im Rahmen einer Überlebenskurve analysiert. Dazu wurden wildtypische Mäuse, mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse und als Kontrolle IFN $\gamma$ -Rezeptor *knock-out* Mäuse mit  $4 \cdot 10^6$  PFUs MCMV infiziert und täglich kontrolliert. Das Überleben der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Es konnte keine erhöhte Letalität bei den mGBP2-defizienten Mäusen beobachtet werden. Die Wildtypkontrollen, die mGBP2 und die IFN $\gamma$ -Rezeptor *knock-out* Mäuse überlebten die Infektion im beobachteten Zeitraum.

Um die Viruslast in den Organen der infizierten Tiere bestimmen zu können wurden pro Zeitpunkt 3 bzw. 4 Tiere mit  $4 \cdot 10^6$  PFU infiziert. Zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h, 14 Tage und 21 Tage (Experiment 1 und 2) bzw. 48 h, 72 h und 96 h (Experiment 3) wurden die Organe analysiert. Milz, Speicheldrüsen, Leber und Lunge wurden entnommen, in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für den Virus-Assay wurden die Organe homogenisiert (Methoden, 2.5.2) und mit dem virushaltigen Organlysat wurden entweder Fibroblasten (BALB/c immortal fibroblasts, BIM) infiziert oder das Organlysat wurde direkt für den Luciferase-Assay eingesetzt.

Infiziert man die Fibroblasten mit dem Organlysat und misst nach 24 h die Luciferase-Aktivität im Zellysat, wird die Menge an Virus in den Organen gemessen, welches noch replikationsfähig war. Misst man die Luciferase-Aktivität direkt aus dem Organlysat, misst man die Menge an Virus im Organ, welches infektiös war, aber kann keine Rückschlüsse auf die Replikationsfähigkeit ziehen (Trilling et al., 2011).

Zuerst sollte untersucht werden, ob die Viruslast in mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen erhöht ist. Dies wurde bestimmt, indem die Luciferase-Aktivität im Organlysat direkt gemessen wurde. Es können nur relative Luciferase-Einheiten (*relative Luciferase Units*, RLUs) angegeben werden, da es nicht möglich ist, eine Virus-Standardkurve anzufertigen.

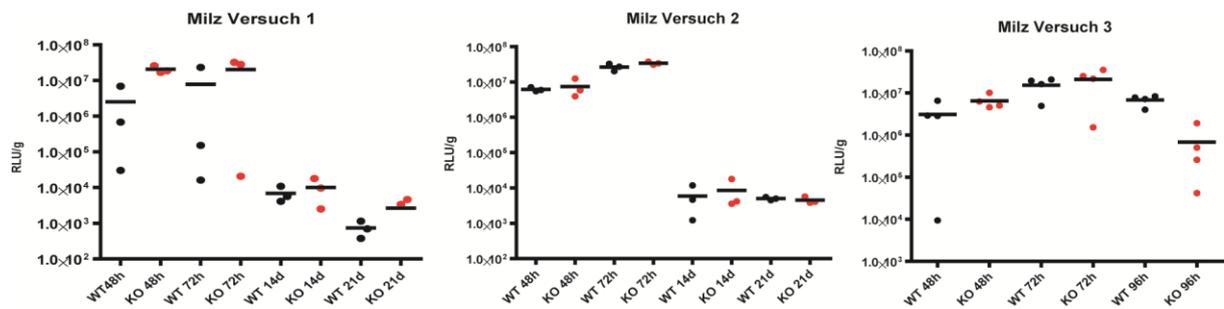


Abbildung 44: Viruslast nach MCMV Infektion in der Milz von WT (schwarz) und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Gezeigt ist die Infektionsrate der Milz in drei verschiedenen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigt n=3, Versuch 3 zeigt n=4 Tiere pro Zeitwert. Die RLUs sind in Relation zum Organgewicht in logarithmischer Weise dargestellt.

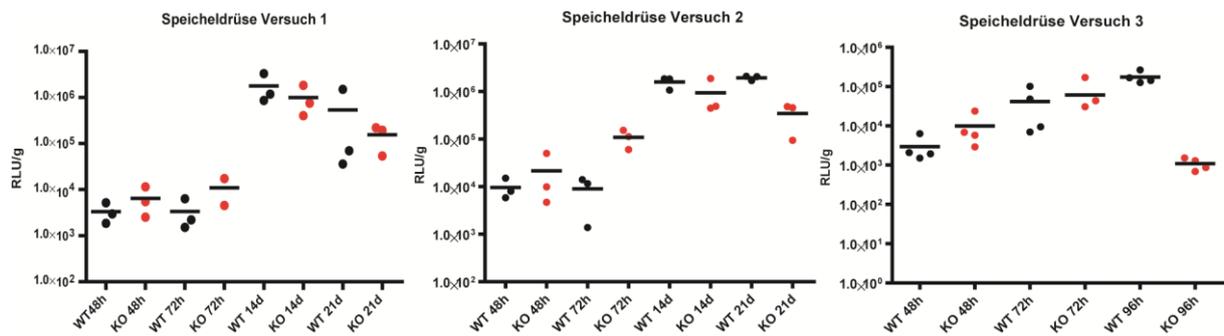


Abbildung 45: Viruslast nach MCMV Infektion in der Speicheldrüse von WT (schwarz) und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Gezeigt ist die Infektionsrate der Speicheldrüse in drei verschiedenen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigt n=3, Versuch 3 zeigt n=4 Tiere pro Zeitwert. Die RLUs sind in Relation zum Organgewicht in logarithmischer Weise dargestellt.

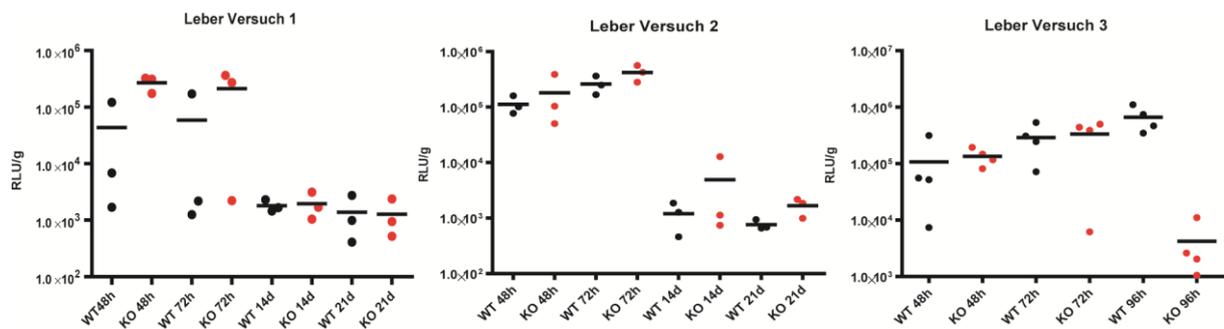


Abbildung 46: Viruslast nach MCMV Infektion in der Leber von WT (schwarz) und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Gezeigt ist die Infektionsrate der Leber in drei verschiedenen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigt n=3, Versuch 3 zeigt n=4 Tiere pro Zeitwert. Die RLUs sind in Relation zum Organgewicht in logarithmischer Weise dargestellt.

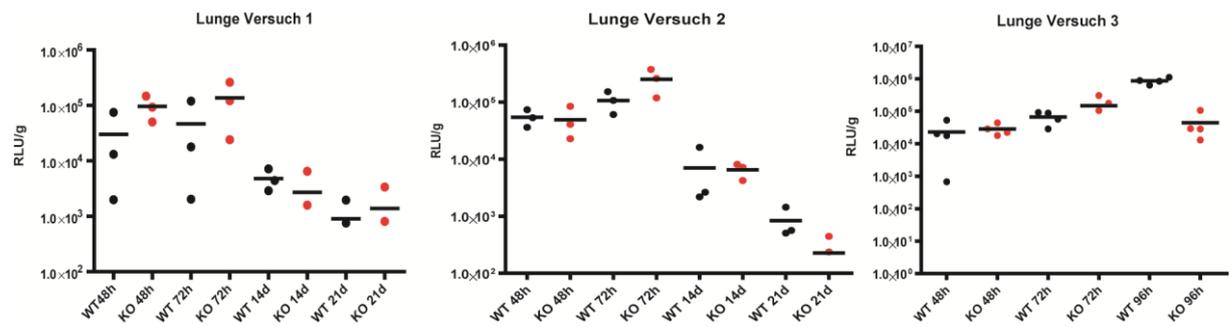


Abbildung 47: Viruslast nach MCMV Infektion in der Lunge von WT (schwarz) und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Gezeigt ist die Infektionsrate der Lunge in drei verschiedenen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigt n=3, Versuch 3 zeigt n=4 Tiere pro Zeitwert. Die RLUs sind in Relation zum Organgewicht in logarithmischer Weise dargestellt.

In Abbildung 44 zeigt sich, dass sowohl in wildtypischen Mäusen, als auch in mGBP2-defizienten Mäusen die Infektionsrate der Milzen vergleichbar sind und sich kaum unterscheiden. Auch in den Speicheldrüsen ist zu erkennen, dass die Infektionsrate (Abbildung 45) in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbar ist, allerdings ist tendenziell eine leichte Erhöhung in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen festzustellen. Abbildung 46 zeigt, dass sich die Viruslast in der Leber nach Infektion kaum zwischen WT und mGBP2<sup>-/-</sup> unterscheidet. Nur im Versuch 1 zeigt sich eine tendenziell erhöhte Infektionsrate während der frühen Versuchszeitpunkte. Auch in der Lunge ist keine unterschiedliche Infektionsrate festzustellen Abbildung 47.

Des Weiteren wurde verfolgt, ob in mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen die Virusreplikation beeinflusst ist. Dazu wurde die Menge an replikationsfähigem Virus gemessen, welches in den Organen gebildet wird. Um replikationsfähiges Virus zu messen, wird das virushaltige Organlysat auf Fibroblasten gegeben. Nur replikationsfähiges Virus ist in der Lage, die Fibroblasten neu zu infizieren und innerhalb der Zelle viruskodierte Proteine zu synthetisieren (im Versuch u.a. Luciferase). Im Versuch wurden auch Fibroblasten mit definierten Mengen an Virus infiziert, sodass die Luciferase-Aktivität in diesen Zellen als Grundlage für eine Standardkurve diente, mit deren Hilfe die RLUs in tatsächliche Virustiter (*Plaque forming Units*, PFUs) umgerechnet werden konnten (Rücksprache Albert Zimmermann, Virologie, Düsseldorf).

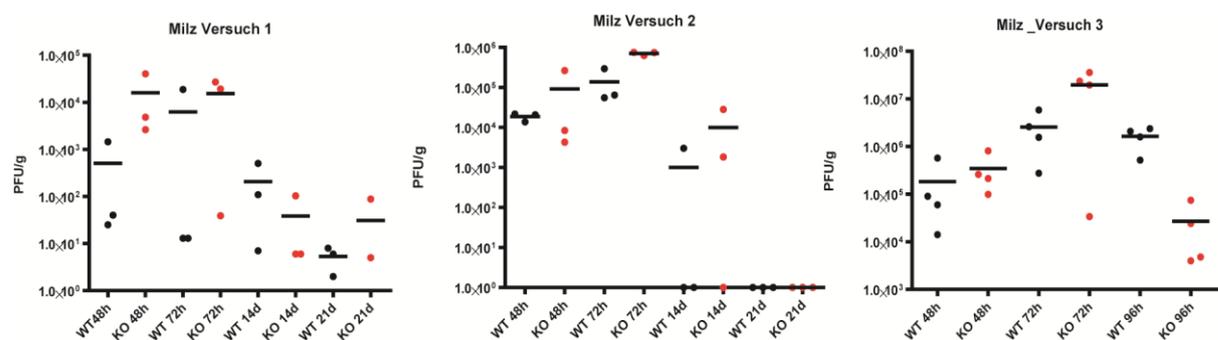
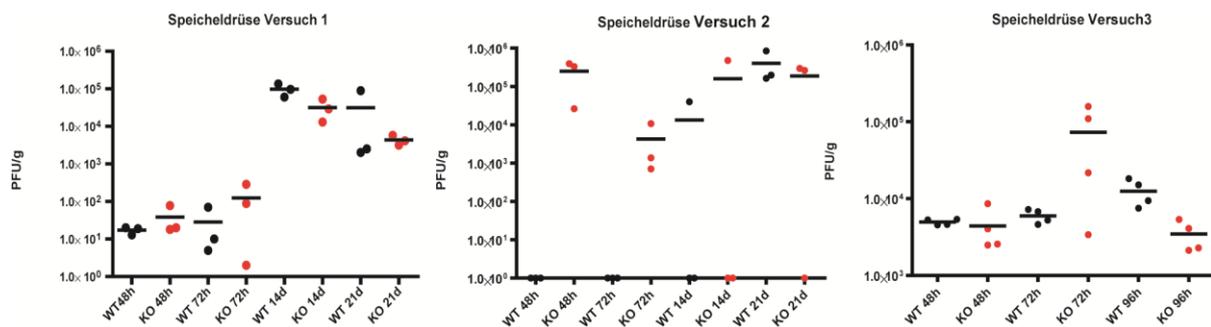


Abbildung 48: Viruslast nach MCMV Infektion in der Milz von WT (schwarz) und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Gezeigt ist die Messung von replikationsfähigem MCMV in der Milz, in drei verschiedenen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigt n=3, Versuch 3 zeigt n=4 Tiere pro Zeitwert. Die ermittelten RLUs

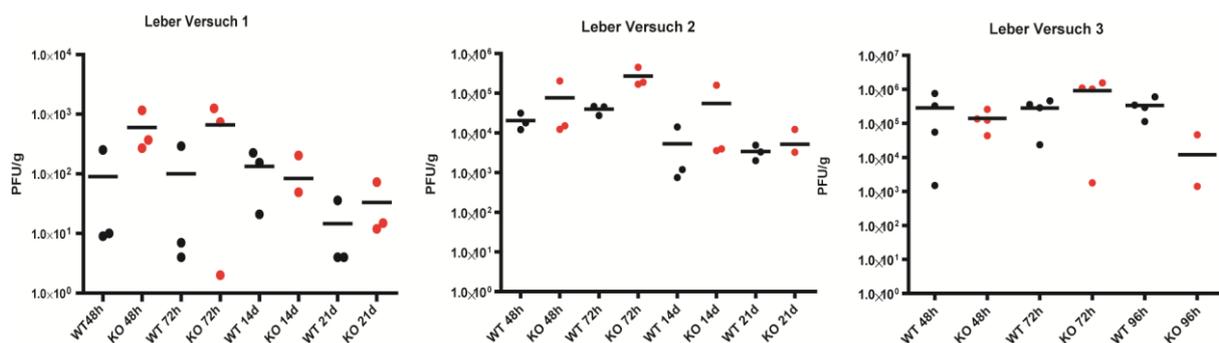
konnten mittels einer Standardkurve in PFUs umgerechnet werden und werden logarithmisch in Relation zum Organgewicht dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen (Abbildung 48), dass die Viruslast in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen tendenziell erhöht ist, besonders während der frühen Phase der Infektion. Daraus kann man schließen, dass mehr replikationsfähiges Virus in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen produziert werden kann, was nicht auf eine erhöhte Infektionsrate der Organe zurückzuführen ist (Abbildung 44).



**Abbildung 49:** Viruslast nach MCMV Infektion in der Speicheldrüse von WT (schwarz) und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Gezeigt ist die Messung von replikationsfähigem MCMV in der Speicheldrüse, in drei verschiedenen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigt n=3, Versuch 3 zeigt n=4 Tiere pro Zeitwert. Die ermittelten RLUs konnten mittels einer Standardkurve in PFUs umgerechnet werden und werden logarithmisch in Relation zum Organgewicht dargestellt.

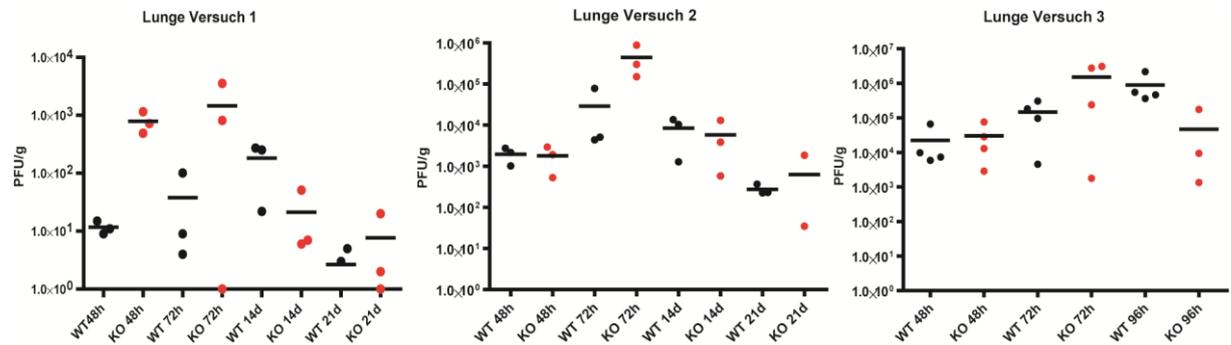
In der Speicheldrüse zeigt sich schon im Versuch 1 eine tendenziell erhöhte Virusreplikation während der frühen Zeitpunkte nach Infektion (Abbildung 49). Ein drastischerer Phänotyp konnte im zweiten MCMV Infektionsversuch beobachtet werden. Hier konnte kein Virus in den WT Mäusen zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h nach Infektion nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war in dritten Versuch weniger ausgeprägt, jedoch konnte auch hier nach 72 h ein deutlicher Unterschied festgestellt werden.



**Abbildung 50:** Viruslast nach MCMV Infektion in der Leber von WT (schwarz) und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Gezeigt ist die Messung von replikationsfähigem MCMV in der Leber, in drei verschiedenen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigt n=3, Versuch 3 zeigt n=4 Tiere pro Zeitwert. Die ermittelten RLUs konnten mittels einer Standardkurve in PFUs umgerechnet werden und werden logarithmisch in Relation zum Organgewicht dargestellt.

In der Leber zeigen sich erhöhte Virustiter in den Versuchen 1 und 2 (Abbildung 50) in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Eine erhöhte Viruslast zeigt sich in allen drei Versuchen besonders zum Zeitpunkt 72 h nach Infektion (Abbildung 50). Im dritten Versuch zeigt

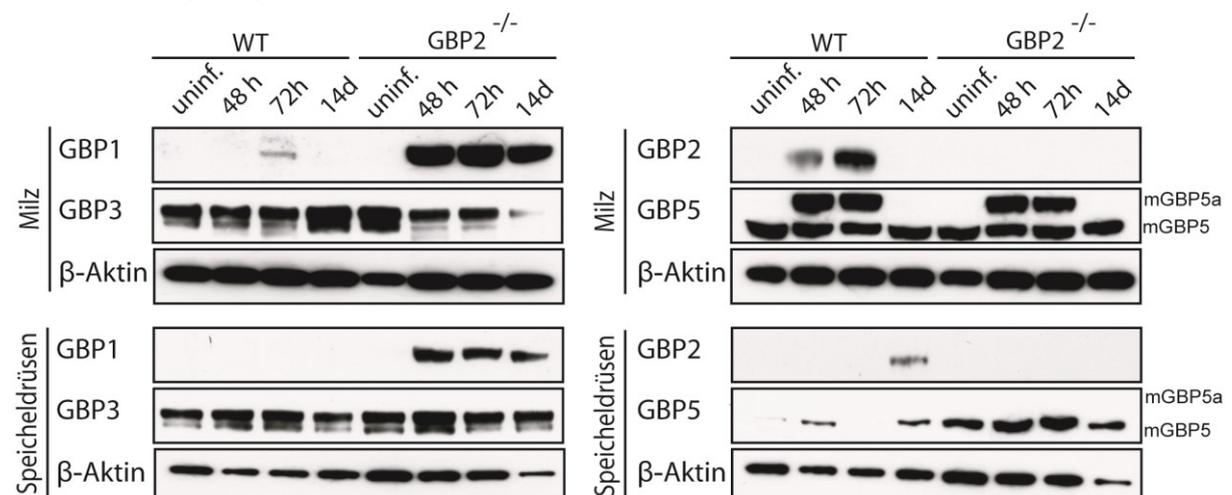
sich kein erhöhter Virustiter nach 96 h in den mGBP2-defizienten Mäusen (Abbildung 50). Allerdings zeigen die Versuche 1 und 2 auch zu den Zeitpunkten 14 d und 21 d nach Infektion erhöhte Viruslasten in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 50).



**Abbildung 51:** Viruslast nach MCMV Infektion in der Lunge von WT (schwarz) und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (rot). Gezeigt ist die Messung von replikationsfähigem MCMV in der Lunge in drei verschiedenen Versuchen. Versuch 1 und 2 zeigt n=3, Versuch 3 zeigt n=4 Tiere pro Zeitwert. Die ermittelten RLUs konnten mittels einer Standardkurve in PFUs umgerechnet werden und werden logarithmisch in Relation zum Organgewicht dargestellt.

In der Lunge zeigen sich ebenfalls ähnliche Virustiter nach Infektion (Abbildung 51). In der frühen Phase zeigt sich zum Zeitpunkt 72 h nach Infektion eine erhöhte Replikationsrate des Virus in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 51). Wohingegen zum Zeitpunkt 96 h im Versuch 3 die Verhältnisse umgekehrt vorliegen, hier ist die Viruslast in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen geringer. Im späteren Infektionsverlauf zeigen sich keine tendenziellen Unterschiede zwischen WT und mGBP2-defizienten Mäusen.

Nachfolgend sollte überprüft werden, wie sich die Expression der mGBPs nach Virusinfektion verändert und ob die Expression eventuell durch die Virusinfektion beeinflusst wird. Dazu wurden die Organlysate des zweiten Infektionsversuches, die auch für den Luciferase Assay verwendet wurden, mittels Western Blot auf mGBP Expression untersucht. Es wurden nicht infizierte Organe von WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen als Kontrollen mitgeführt. Es wurde das Organlysat eines Tieres (WT1 bzw. KO1) pro Zeitpunkt aufgetragen.



**Abbildung 52:** Western Blot. Expression von mGPB1, 2, 3 und 5 in Milz und Speicheldrüsen von MCMV infizierten WT oder mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen zu den Zeitpunkten uninfiziert, 48 h, 72 h und 14 Tage nach Infektion. Gezeigt ist eine Membran, die jeweils mit Antikörper gegen mGBP1, mGBP3 oder

mGBP2 und mGBP5 mit entsprechender  $\beta$ -Aktin Ladekontrolle inkubiert wurde, die entsprechende Ladekontrolle ist unter den dazugehörigen Blots gezeigt.

Zuerst wurde die mGBP-Expression der Milzen und Speicheldrüsen nach MCMV Infektion untersucht (Abbildung 52). In Milz und Speicheldrüse zeigt sich, dass mGBP1 in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen dereguliert vorlag. In den mGBP2-defizienten Mäusen erfolgt die Expression bereits nach 48 h und die Proteinmengen sind deutlich erhöht im Vergleich zu den WT Mäusen. Die Expression von mGBP3 liegt in Milz und Speicheldrüsen konstitutiv vor, wie bereits beschrieben (Degrandi et al., 2007), und wird nicht durch MCMV beeinflusst.

mGBP2 wird in der Milz nach 48 h induziert und erreicht eine maximale Expression 72 h nach Infektion. Zum Zeitpunkt 14 Tage p.i. ist die Expression nicht mehr nachweisbar. Dies könnte auf eine Rolle von mGBP2 in der frühen Phase der Infektion hinweisen. Dies zeigt sich für mGBP2 auch im Infektionsversuch, nach 14 Tagen war die Viruslast in Organen der *knock out* Maus nicht erhöht (Abbildung 44 und Abbildung 48). In der Milz wird mGBP5 basal exprimiert, allerdings zeigt sich zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h nach Infektion eine Spleißvariante des Proteins (mGBP5a, 68 kDa). Diese mGBP5-Proteinvariante konnte auch 24 h nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* aber nicht nach Infektion mit *T. gondii* beobachtet werden (Degrandi et al., 2007). Die Expression der Spleißvariante in den frühen Infektionsphasen könnte auf eine Funktion von mGBP5a in der MCMV-Abwehr hinweisen. In den Speicheldrüsen kann mGBP5a nach Infektion nicht detektiert werden. Auch liegt keine Expression in den WT Mäusen im nichtinfiziertem Zustand und 72 h nach Infektion vor.

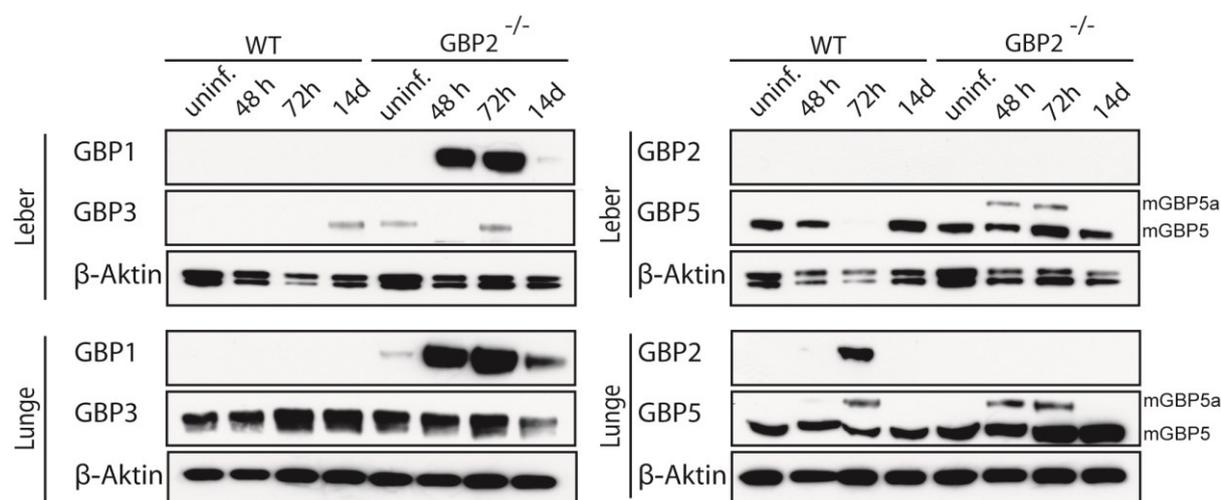


Abbildung 53: Western Blot. Expression von mGBP1, 2, 3 und 5 in Leber und Lunge von MCMV infizierten WT oder mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen zu den Zeitpunkten uninfiziert, 48 h, 72 h und 14 Tage nach Infektion. Gezeigt ist eine Membran, die jeweils mit Antikörper gegen mGBP1, mGBP3 oder mGBP2 und mGBP5 mit entsprechender  $\beta$ -Aktin Ladekontrolle inkubiert wurde, die entsprechende Ladekontrolle ist unter den dazugehörigen Blots gezeigt.

Auch in Leber und Lunge (Abbildung 53) zeigt sich in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen eine De-regulation von mGBP1. In den WT Mäusen kann keine mGBP1-Expression in Leber oder Lunge nachgewiesen werden. In den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigt sich eine induzierte mGBP1 Expression 48 h und 72 h nach MCMV

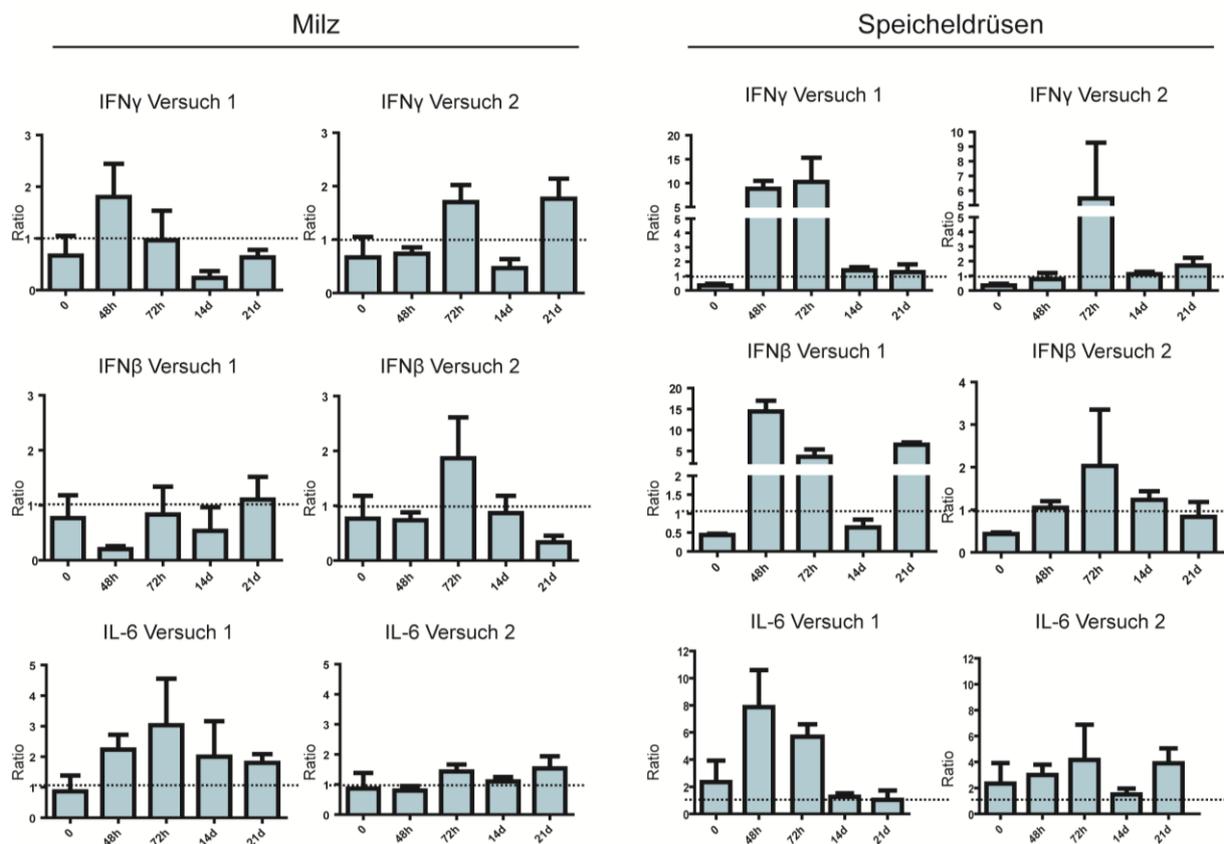
Infektion. In der Lunge ist schon im nicht infizierten Zustand ein geringes Level an mGBP1 nachzuweisen, die Expression wird durch MCMV Infektion verstärkt.

Für mGBP3 und mGBP5 wurde in der Leber eine konstitutive, basale Expression beschrieben (Degrandi et al., 2007), welche aber in diesem Versuch nicht vorliegt. In der Leber zeigt mGBP3 ein anderes Expressionsmuster als in Milz, Speicheldrüse (Abbildung 52) und Lunge, in denen eine konstitutive Expression besteht. In der Leber wird mGBP3 lediglich in den WT Mäusen nach 14 d exprimiert und in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen bereits im nicht infizierten Zustand und wieder zum Zeitpunkt 72 h nach Infektion (Abbildung 53).

Die Leber zeigt eine gleichmäßige Expression von mGBP5 bis auf den Zeitpunkt 72 h nach Infektion in den WT Mäusen. Dies sollte weiter überprüft werden, ob die Expression tatsächlich so vorliegt oder ein methodischer Fehler das Fehlen der Bande bedingt. In der Leber der mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigt sich eine Induktion der mGBP5a Spleißvariante zum Zeitpunkt 48 h und 72 h nach Infektion. Ein mGBP2-Signal konnte in der Leber von den WT Tieren nicht detektiert werden. In der Lunge kommt es sowohl in WT als auch in mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer konstitutiven Expression von mGBP5 und einer Induktion von mGBP5a zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h nach Infektion in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen und zum Zeitpunkt 72 h nach Infektion in den WT Mäusen. mGBP2 lässt sich 72 h nach Infektion in den Lungen von WT Mäusen detektieren. Ob die teilweise erhöhten Virustiter in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen mit einer Defizienz in der Produktion verschiedener Zytokine zu begründen sind, sollte mittels Expressionslevel durch Real-time PCR-Analysen festgestellt werden. Es wurden von zwei Versuchen RNA aus den infizierten Organen präpariert und für die Real-time Analysen eingesetzt (Methoden, 3.4.7). Aufgrund quantitativer Unterschiede zwischen den Versuchen werden diese getrennt dargestellt. Als Vergleichswert dienten mRNA-Level in infizierten WT-Mäusen. Die Balken zeigen somit das Verhältnis der mRNA-Level in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen zu den Mengen in WT Mäusen.

Besonders wichtig für die Immunabwehr ist in der frühen Phase der MCMV-Infektion die Produktion von IFN $\alpha/\beta/\gamma$  und TNF $\alpha$  (Dalod et al., 2003; Hengel et al., 1994). IFN $\alpha/\beta$  wird von einer Subpopulation der Dendritischen Zellen (DCs) produziert, dadurch werden NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert (Dalod et al., 2003). Die NK-Zellen sind essentiell für die frühe Immunabwehr von MCMV. IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  sind während der späten Phasen der MCMV-Infektion wichtig (Hengel et al., 1995; Hengel et al., 1994). Durch sie wird die Präsentation von Viruspeptiden durch MHC I Moleküle für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufrechterhalten. Des Weiteren werden eine Vielzahl von Effektormolekülen durch IFN $\gamma$  induziert, u.a. die Expression der mGBPs. Auch TNF $\alpha$  wurde in der MCMV-Abwehr als essentiell beschrieben (Dalod, 2003). In der Abfolge der Entzündungskaskaden nach Aktivierung von TNF $\alpha$  wird IL-6 induziert. Dabei nimmt IL-6 eine Schlüsselfunktion im Übergang von der angeborenen hin zur erworbenen Immunität ein. Die Mechanismen der erworbenen Immunität sind besonders wichtig während der späten Phase der MCMV Infektion und einer möglichen Reaktivierung aus der latenten Phase (Dalod et al., 2003).

Um herauszufinden, ob die Immunkontrolle von MCMV in  $mGBP2^{-/-}$  Tieren beeinträchtigt ist, und daher die erhöhten Virustiter zu erklären sind, wurden die Expressionslevel einiger Moleküle überprüft, die wichtig für die Immunabwehr von MCMV sind (IFN $\gamma$ , IFN $\beta$ , IL-6).

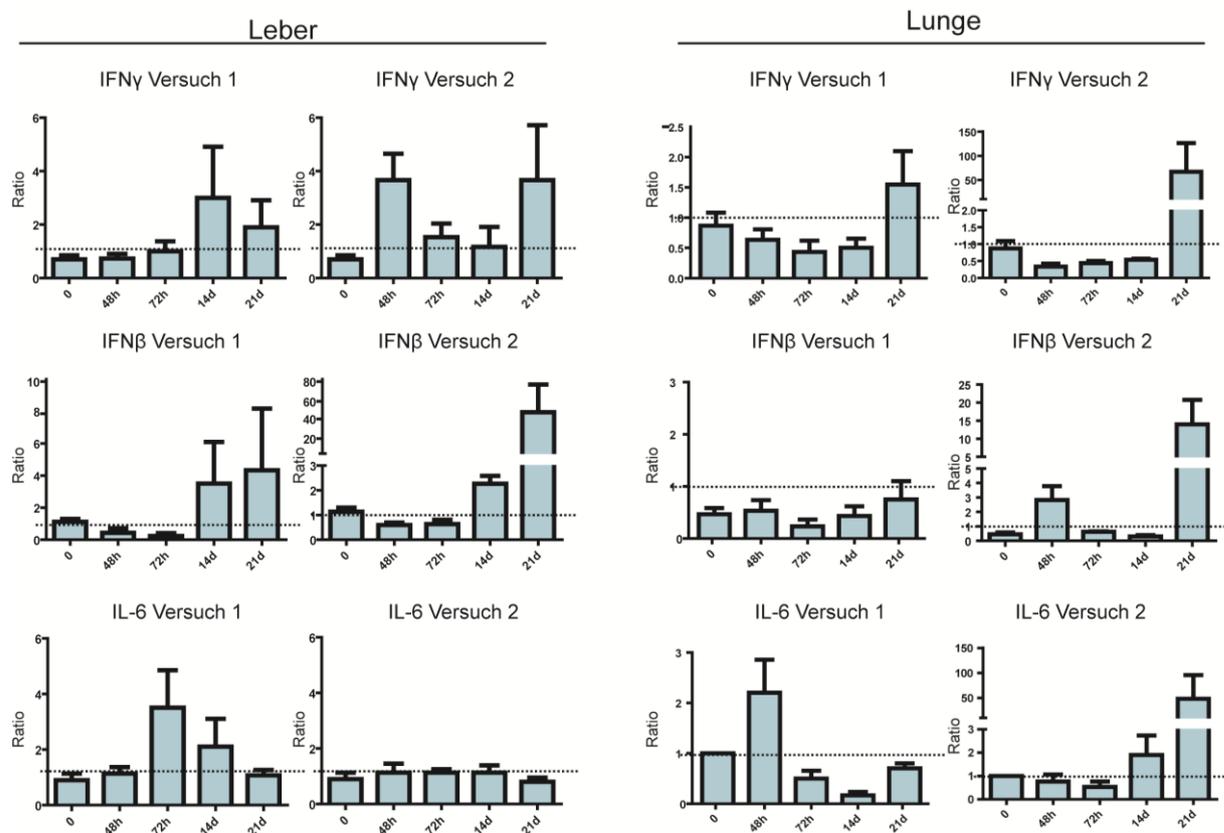


**Abbildung 54:** Real-Time PCR-Ergebnisse für Milz und Speicheldrüsen aus zwei MCMV-Infektionsversuchen. Gemessen wurde die Ratio an mRNA für IFN $\gamma$ , IFN $\beta$  und IL-6 in Organen von  $mGBP2^{-/-}$  Mäusen. Die Y-Achsen zeigen das Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp. Die Linie zeigt das wildtypische mRNA Level (normiert auf 1).

In der Milz (Abbildung 54) weichen die Mengen an IFN $\gamma$  mRNA in beiden ausgewerteten Versuch stark ab. Im Versuch 1 wird IFN $\gamma$  48 h nach Infektion hochreguliert, zu den darauf folgenden Zeitpunkten sinkt es sogar unter das Level, welches in den WT Mäusen vorliegt. Im Versuch 2 zeigen sich zwei Höhepunkte im mRNA-Level, zum Zeitpunkt 72 h und 21 d nach Infektion.

Die IFN $\beta$  mRNA sinkt in beiden Versuchen tendenziell zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion unterhalb das Level des WT-Niveaus, wird aber nur in Versuch 2 72 h nach Infektion im Vergleich zum WT hochreguliert. IL-6 wird nur in Versuch 1 nach Infektion hochreguliert, in Versuch 2 zeigen sich keine Unterschiede zum WT-mRNA-Level. In der Speicheldrüse (Abbildung 54) wird IFN $\gamma$  in beiden Versuchen in  $mGBP2^{-/-}$  Mäusen hochreguliert, wenn auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, 14 Tage nach der Infektion ist das mRNA-Level wieder mit dem in den WT Mäusen vergleichbar. Auch IFN $\beta$  zeigt eine Hochregulation nach MCMV Infektion in den Speicheldrüsen von  $mGBP2^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu WT Tieren. Aber nur in Versuch 1 zeigt sich ein zweiter Höhepunkt 21 d nach Infektion. Tendenzuell wird IL-6 in beiden Versuchen induziert, mit Unterschieden in

der Ausprägung. Im Versuch 2 zeigt sich für IL-6 ein zweiter Höhepunkt 21 Tage nach Infektion.



**Abbildung 55: Real-Time PCR-Ergebnisse für Leber und Lunge aus zwei MCMV-Infektionsversuchen.** Gemessen wurde die Ratio an mRNA für IFN $\gamma$ , IFN $\beta$  und IL-6 in Organen von mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Y-Achsen zeigen das Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp. Die Linie zeigt das wildtypische mRNA-Level (normiert auf 1).

In der Leber (Abbildung 55) zeigen sich in beiden Versuchen unterschiedliche Tendenzen bei den IFN $\gamma$  mRNA-Transkripten. Der Anstieg im IFN $\beta$  mRNA-Level ist in der Leber in beiden Versuchen tendenziell nachweisbar. IL-6 wird in Versuch 1 in der Leber zum Zeitpunkt 72 h hochreguliert, wobei sich im zweiten Versuch keine Unterschiede zeigen. In der Lunge zeigt sich eine ähnliche Tendenz in beiden Versuchen bei der IFN $\gamma$  mRNA-Transkription. In Versuch 1 wird IFN $\beta$  in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den WT Kontrollen scheinbar herunterreguliert. In Versuch 2 zeigt sich dagegen eine Hoch-regulation von IFN $\beta$  zum Zeitpunkt 48 h und 21 d nach Infektion in den mGBP2-defizienten Mäusen im Verhältnis zu den WT Mäusen. Die IL-6-Messungen zeigen in der Lunge sowie in der Leber in beiden Versuchen stark unterschiedliche Tendenzen. In Versuch 1 wird es 48 h nach Infektion in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen hochreguliert (im Vergleich zu den WT Mäusen) und zum Zeitpunkt 14 d nach Infektion herunterreguliert. In Versuch 2 zeigt sich eine Hochregulation erst 14 d nach Infektion, die sich zum Zeitpunkt 21 d weiter verstärkt.

Vergleicht man nun die mRNA-Mengen der einzelnen Versuche mit den entsprechenden Virustiter-Diagrammen, lässt sich kein Zusammenhang erkennen, ob bestimmte Zytokine

nun in der mGBP2-defizienten Maus differenziell exprimiert werden und ob im Vergleich von WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen damit die Viruslast kontrolliert wird. Abschließend lässt sich sagen, dass die erhöhte Viruslast in der mGBP-*knock out* Maus mit einer Induktion verschiedener mGBPs, nicht aber mit der differentiellen Expression von IFN $\gamma$ , IFN $\beta$  oder IL-6, einhergeht.

#### 4.4.2 Infektion von mGBP2<sup>-/-</sup> Tieren mit *T. gondii*

Es wurde bereits gezeigt, dass mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer *T. gondii* Infektion aufweisen (Degrandi et al., 2007). Die Mäuse zeigten nach einer Infektion mit 40 Zysten i.p. sowohl eine erhöhte Sterblichkeit als auch eine erhöhte Anzahl an Zysten im Gehirn. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese erhöhte Suszeptibilität durch Unterschiede bei der Differenzierung oder Aktivierung von Immunzellen erklärbar sind. Für die Analyse wurde die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) angewandt. Hierbei können Zellpopulationen anhand von Oberflächenmarkern phänotypisiert werden, indem diese mit Antikörpern markiert werden. Die Antikörper sind mit einem Fluorophor gekoppelt und können somit im Durchflusszytometer detektiert werden. Nachdem die Zellen an einem Laserstrahl hindurchgeflossen sind, werden sie anhand ihrer Fluoreszenz elektronisch eingegrenzt (*gated*). Die Größe der Zellen lässt sich mit Hilfe des Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und die Granularität durch das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) charakterisieren.

Zuerst wurden von mGBP2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen die Milz sowie die Lymphknoten präpariert, wie im Material und Methoden-Teil beschrieben und die FACS-Färbung durchgeführt (Abschnitt 2.5.3.1 und 2.6). Mit Hilfe von Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker wurden B-Zellen (B220), T-Zellen (CD90), DCs (CD11c+) und Monozyten/Makrophagen/Granulozyten (CD11b+) untersucht. Hier sollte untersucht werden, ob bereits ohne Infektion ein basaler Unterschied bei den Zellpopulationen zu detektieren ist (Abbildung 56).

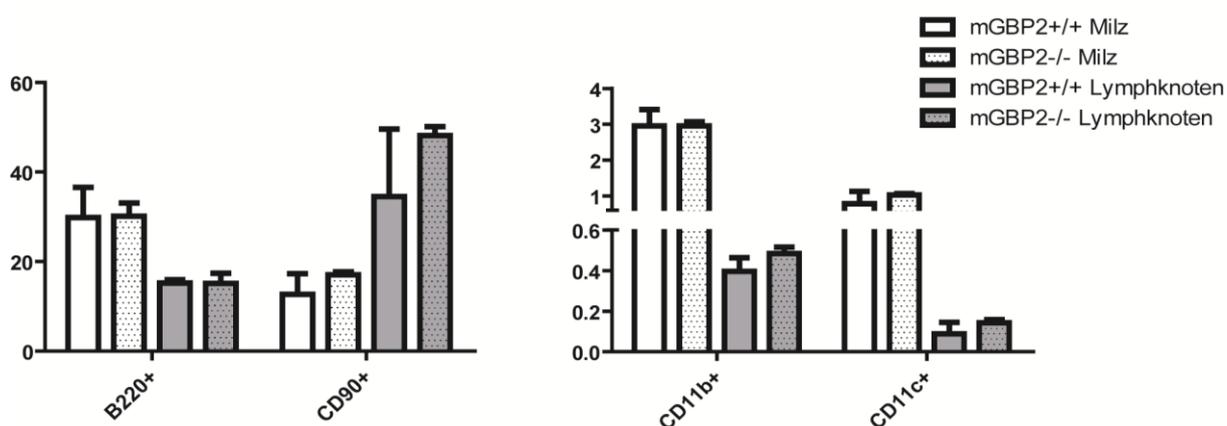


Abbildung 56: FACS-Analyse von Milz und Lymphknoten in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Es wurde auf die Oberflächenmarker B220 für B-Zellen, CD90 für T-Zellen, CD11b<sup>+</sup> für vorwiegend Monozyten/Makrophagen/Granulozyten/NK-Zellen und CD11c<sup>+</sup> für vorwiegend Dendritische Zellen *gated*. Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der Zellen von der Gesamtzellzahl.

Im Versuch mit nicht-infizierten Mäusen konnte kein basaler Unterschied zwischen WT und mGBP2<sup>-/-</sup> festgestellt werden.

Ob sich die Zellpopulationen nach *T. gondii* Infektion verändern und ob Defizite in der mGBP2-defizienten Maus beobachtet werden können, sollte im Folgenden genauer analysiert werden.

Dazu wurden pro Experiment für jeden Zeitpunkt drei WT und drei mGBP2<sup>-/-</sup> Tiere mit 20 Zysten *T. gondii* i.p. infiziert. Zu den Zeitpunkten Tag 3, 7, 12 und 30 wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen und Milz, Leber und Lungen auf bestimmte Immunzellpopulationen untersucht.

Es wurden Granulozyten (Gr1+CD11b+) und Makrophagen (Gr1<sup>low</sup>CD11b+) sowie CD11b+/CD11c+ mDC Zellpopulationen. Die Organe wurden wie im Material und Methoden Teil beschrieben präpariert und die FACS-Färbung durchgeführt (Abschnitt 3.6.3.2 und 3.7).

Der Versuch konnte nur bis Tag 12 nach Infektion ausgewertet werden, da in diesem Versuch alle mGBP2<sup>-/-</sup> Tiere noch vor Tag 30 verstorben waren. Eine Auswertung der T- und B-Zell-Populationen war aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht möglich.

Nachfolgend werden die FACS-Histogramme für jeweils eine WT Maus und eine *knock-out* Maus gezeigt (Abbildung 57, Abbildung 60). Alle *Dot-Plots* werden im Anhang aufgeführt.

Zunächst werden die FACS-Färbungen für Granulozyten (Gr1+CD11b+) und Makrophagen (Gr1<sup>low</sup>CD11b+) in Form von Dot-Plots dargestellt (Abbildung 57).

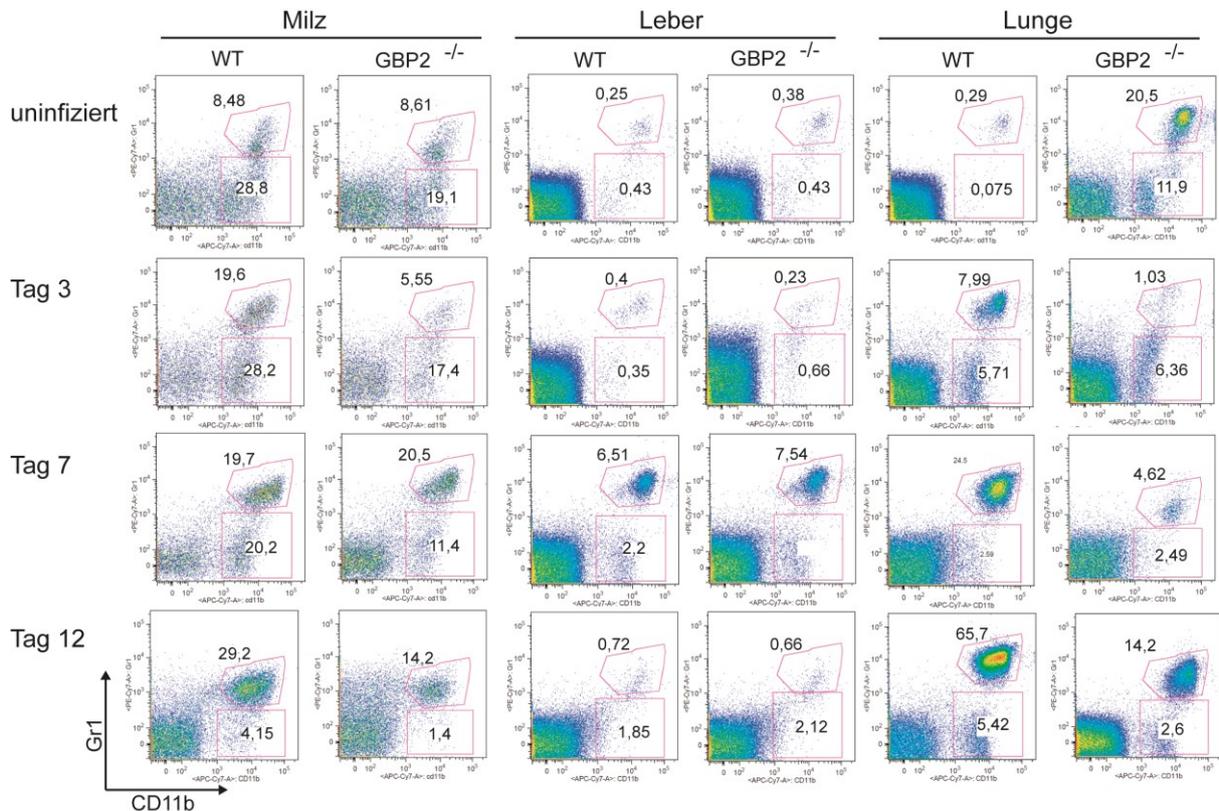


Abbildung 57: Dot-Plots der FACS-Analyse von Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Organen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden Gr1<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> doppelpositive Zellen analysiert (Granulozyten), sowie Gr1<sup>low</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen (Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen).

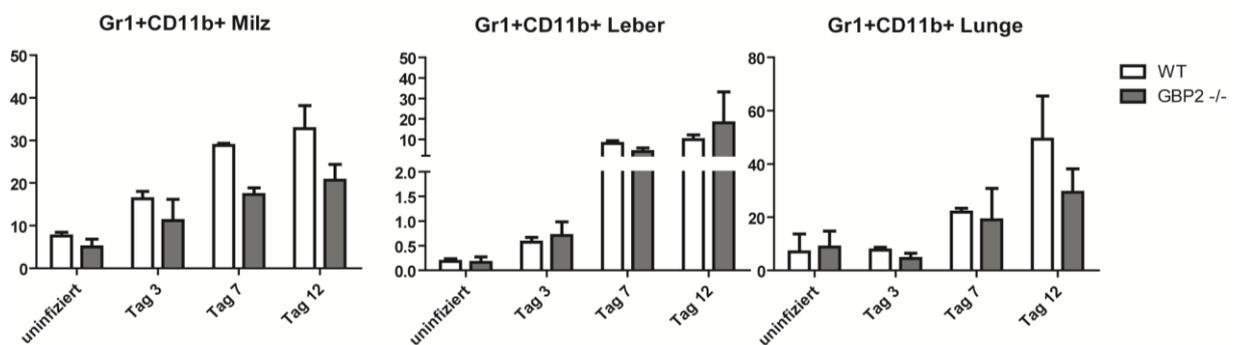


Abbildung 58: Zellpopulationen in Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus uninfizierten und *T. gondii* infizierten Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden die doppelpositive Gr1 und CD11b Zellen (Granulozyten) ausgewertet. Die Diagramme zeigen die Daten für alle Mäuse aus dem Versuch (n=3). Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil an lebenden Zellen.

In der Milz zeigt sich, dass die Anzahl der Granulozyten (Gr1+CD11b+; Abbildung 58) zu allen Zeitpunkten in der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus verringert ist (Abbildung 58). Auch in der Lunge kann man an Tag 12 eine verringerte Anzahl an Gr1+CD11b+ Zellen in der mGBP2-defizienten Maus detektieren. Die Leber zeigt einen dramatischen Anstieg in der

Granulozyten-population nach *T. gondii* Infektion, der sich allerdings nicht wesentlich zwischen WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen unterscheidet.

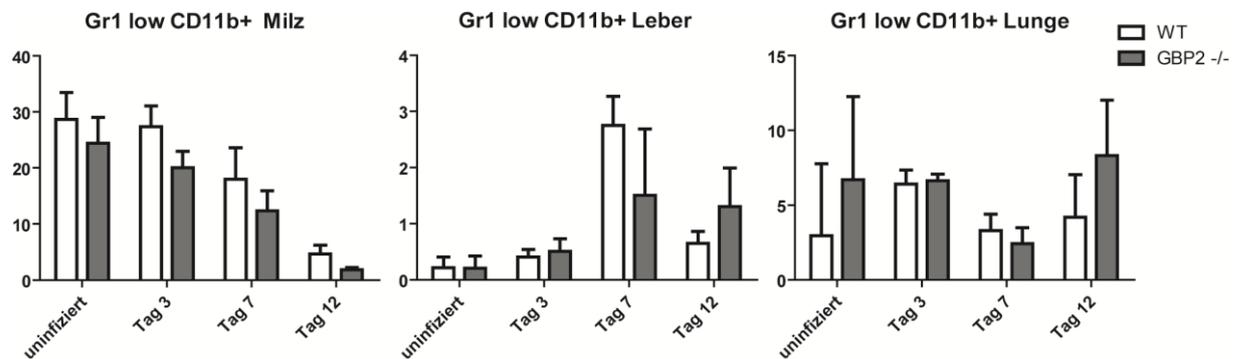


Abbildung 59: Zellpopulationen in Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus uninfizierten und *T. gondii* infizierten Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden die Gr1<sup>low</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen (Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen) ausgewertet. Die Diagramme zeigen die Daten für alle Mäuse aus dem Versuch (n=3). Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil an lebenden Zellen.

Die Zahl der Gr1<sup>low</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen ist in den mGBP2-defizienten Mäusen in der Milz im Vergleich zu den WT Mäusen verringert (Abbildung 59). In der Leber der mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigt sich am Tag 7 eine verringerte Monozyten/Makrophagen/NK-Zell-Population im Vergleich zu den WT Mäusen. Inwieweit diese Unterschiede statistisch relevant sind, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Es folgt die Darstellung der FACS-Dot-Plots der CD11c-CD11b Färbungen. Es wurden einfach CD11c-positive Zellen (DCs) und einfach CD11b-positive Zellen (Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen) ausgewertet. Um die CD11b<sup>+</sup> Zellen genauer zu analysieren, sind weitere FACS-Experimente, in denen die Zellen nach weiteren Oberflächenmarkern sortiert werden notwendig.

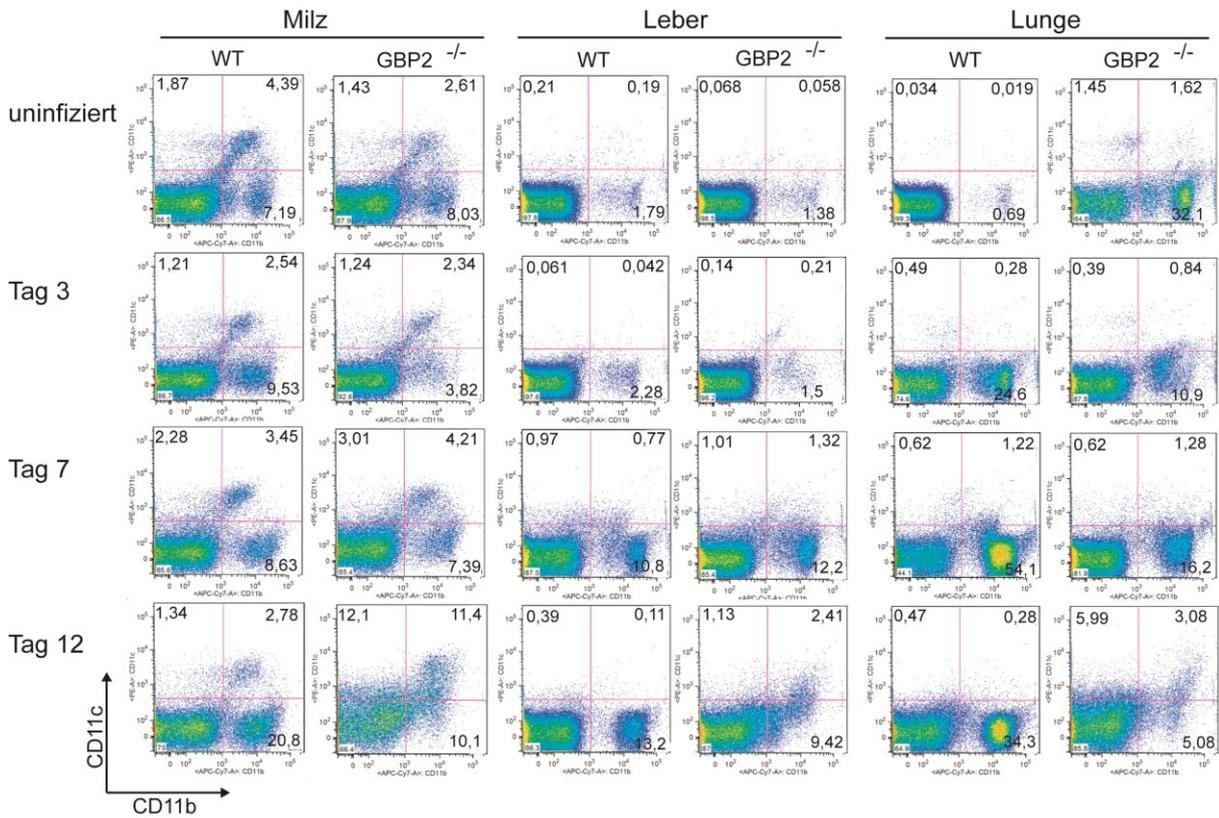


Abbildung 60: Dot-Plots der FACS-Analyse von Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Organen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden DCs (single CD11c<sup>+</sup>) und CD11b<sup>+</sup> Zellen (Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen) analysiert.

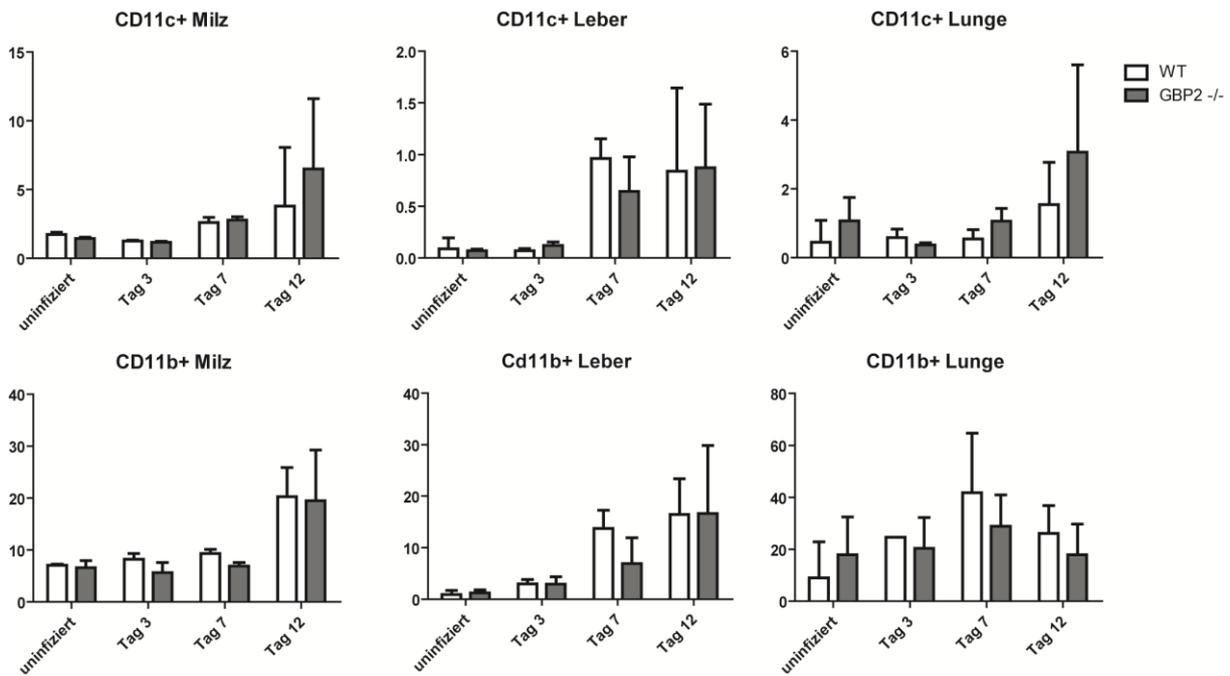


Abbildung 61: Zellpopulationen in Milz, Leber und Lunge in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden CD11c<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen analysiert. Die Diagramme zeigen die Auswertung aller Mäuse aus dem Versuch (n=3). Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil in Bezug auf lebenden Zellen.

Es konnte kein nennenswerter Unterschied in den CD11c<sup>+</sup> oder CD11b<sup>+</sup> Zellpopulationen in den Organen festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Mäusen waren statistisch nicht signifikant.

Der Versuch zeigt in der frühen Phase der Infektion kaum Unterschiede in den Populationen der verschiedenen Immunzellen. Eventuell interessante Auffälligkeiten sollten in weiteren Versuchen genauer untersucht werden. Die verringerte Anzahl an Granulozyten in der Milz nach Infektion (Abbildung 58) könnte auf eine abgeschwächte Reaktion auf die *T. gondii* Infektion hinweisen. Auch die Populationen in der späten Phase der Infektion (>12 Tage) sind besonders interessant, da die Sterblichkeitsunterschiede zwischen WT und mGBP2<sup>-/-</sup> erst später im Verlauf der Infektion auftreten. Ob dies eventuell durch eine Überaktivierung bestimmter Immunzellen hervorgerufen wird, ist eine interessante Fragestellung für die Zukunft.



## 5 Diskussion

Die Zell-autonome Abwehr von intrazellulären Parasiten gehört zu den wichtigsten Aufgaben des angeborenen Immunsystems der Säugetiere. Grundlegend für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen ist die Erkennung parasitärer Strukturen und die darauffolgende Aktivierung verschiedener antimikrobieller Effektormechanismen (Kawai und Akira, 2007). Zu diesen zählen auch die IFN $\gamma$  induzierten GTPasen wie die GBPs. Einige der GBPs akkumulieren nach Infektion an der PV von *T. gondii* und übernehmen entweder selbst eine antimikrobielle Funktion oder sind wichtig für den Transport anderer Effektormoleküle.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der mGBPs nach Infektion mit *T. gondii* zu charakterisieren und herauszufinden, welche Domänen und Motive innerhalb der Proteine wichtig für die Re-lokalisierung der mGBPs zur parasitophoren Vakuole (PV) des Pathogens ist. Des Weiteren sollte die Funktion von mGBP2 im Infektionsmodell Maus nach *T. gondii* und viraler Infektion mit Hilfe der mGBP2<sup>-/-</sup> Mauslinie untersucht werden.

### 5.1 Lokalisation von mGBPs in der Zelle

#### 5.1.1 *Live cell imaging* der mGBP2 Rekrutierung an die *T. gondii* PV

Durch die Induktion mit IFN $\gamma$  werden die mGBPs in der Zelle exprimiert. Mehrere GBPs verteilen sich innerhalb der Zelle in kleine vesikuläre Strukturen. Nach *T. gondii* Infektion relokalisieren die mGBPs und rekrutieren innerhalb der ersten 10-20 min an die PV und umgeben den Parasiten. Die Rekrutierung der mGBPs an die PV ist ein sehr schneller Prozess, der bisher nur in statischen Immunfluoreszenz Färbungen beobachtet wurde (Degrandi et al., 2007). Teil dieser Arbeit war es, die Rekrutierung von GFP-mGBP2 Proteinen während der Infektion mit *T. gondii* in Echtzeit mittels *live cell imaging* zu beobachten. Schon im nicht infizierten Zustand konnte die Dynamik der GFP-mGBP2 Vesikel beobachtet werden. Diese waren nicht statisch in der Zelle, sondern einige Vesikel bewegten sich geringfügig hin und her, andere Vesikel legten weitere Strecken innerhalb der Zelle zurück (Abbildung 8). Die Bewegung über weitere Strecken schien sehr gerichtet und geradlinig, sodass hier eine Assoziation mit Transportproteinen und dem Zytoskelett sehr wahrscheinlich ist. So könnte es sein, dass die Vesikel, die nur geringe Aktivität zeigen, frei in der Zelle vorliegen. Die Vesikel die sich durch die Zelle bewegen könnten vorübergehend Interaktionen mit dem Zytoskelett oder mit Transportproteinen eingehen. Mit Hilfe des *live cell imaging* sollte die Dynamik der mGBP2 Vesikel während und nach der Infektion mit *T. gondii* geklärt werden.

Bereits in den Immunfluoreszenzfärbungen zeigten die mGBPs eine schnelle Rekrutierung zu der PV nach Infektion. Man ging davon aus, dass die Vesikel gerichtet an die PV rekrutieren oder transportiert werden. Im *live cell imaging* Film zeigte sich ein etwas anderes Bild. Schon kurz nach Invasion fusionierten kleine Vesikel, die im Bereich

der Eintrittsstelle zu beobachten waren, mit der PV des Parasiten. Die Rekrutierung der Vesikel zeigte sich jedoch weniger zielgerichtet, sondern stellte sich als dynamischer Prozess von Verschmelzung und Abspaltung (*fusion and fission*) heraus. Außerdem zeigte es sich, dass weniger ganze Vesikel mit der PV verschmelzen, sondern umliegende GFP-mGBP2 Vesikel wurden kleiner und gleichzeitig wurde die Akkumulierung von GFP-mGBP2 um die PV herum größer (Abbildung 8 - Abbildung 12). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass aus den GFP-mGBP2 Vesikel Proteine freigesetzt werden, die daraufhin an der PV akkumulieren.

Die Filme des *live cell imaging* zeigen, dass es sich bei den mGBP Vesikeln um sehr dynamische Zellkompartimente handelt. So konnte gezeigt werden, dass es sich weniger um einen gerichteten Transport ganzer Vesikel handelt sondern, dass die Vesikel wahrscheinlich Proteine oder Oligomere in das Zytoplasma entlassen und die Proteinkomplexe daraufhin mit der PVM in irgendeiner Form interagieren. Es ist weiterhin unklar, ob die GBPs direkt mit der parasitophoren Vakuolen Membran interagieren, in Form einer Integration in die Membran oder sie lediglich in der Nähe der Membran akkumulieren und für den Transport von anderen Effektormolekülen verantwortlich sind. Dies kann mittels konfokaler Mikroskopie und GFP-markierten Proteinen nur schwer untersucht werden, da die Auflösung nicht hoch genug ist. Selleck und Kollegen (Selleck et al., 2013) zeigten, dass Gold markiertes mGBP1 in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sich nur in der Nähe der PV Membran ansammelt. Sodass in diesen Untersuchungen mGBP1 eher eine Rolle als Transportprotein zugeschrieben wird, das andere Proteine an die PV transportiert, die dann weiterhin für ihren Abbau verantwortlich sind (Selleck et al., 2013). Ähnlicherweise wurde vermutet, dass die IRG Proteine als Transportproteine für die mGBPs dienen (Yamamoto et al., 2012).

Ein weiterer Film (Video 02) zeigt, dass von mGBP2 umgebene PVs in ihrer Integrität angegriffen werden. Hier wird die PVM als Schutzschild gegen zelluläre Abbauprozesse angegriffen und aufgelöst.

Um dies zu zeigen, wurden GFP-mGBP2 exprimierende MEFs mit einem Vektor transfiziert, der ein mCherry Konstrukt exprimiert. Die Filmaufnahmen wurden gestartet, nachdem eine infizierte Zelle in den Fokus gesetzt wurde. Es zeigte sich, dass es im Verlauf der Infektion zu einer Disruption der PVM kommt. Dies konnte beobachtet werden, da durch die Zerstörung der PVM zytosolisches mCherry Protein auch in den peri-vakuolären Raum eindringen kann (Abbildung 13-Abbildung 14). Eine Disruption von PVs, die kein mGBP2 Signal zeigten, konnte während der experimentellen Arbeit nicht beobachtet werden. In Zukunft sollte weiter untersucht werden, ob auch mGBP2-negative Vakuolen disruptiert werden. Falls dies nicht der Fall ist, würde es die Rolle von mGBP2 in der *T. gondii* Abwehr weiter stärken.

Eine interessante Beobachtung wurde in den ersten Sekunden des Films mit den mCherry exprimierenden GFP-mGBP2 MEFs gemacht. Hier zeigte sich, dass ein Parasit, dessen PV von GFP-mGBPs umgeben ist, die PV und die Zelle verlässt (Abbildung 15). Die PV bleibt bestehen und weiterhin umgeben von mGBP2. Melzer et

al. (Melzer et al., 2008) beschrieben ähnliches in Astrozyten. Sie zeigten, dass Parasiten eine PV verlassen können, die von IGTP, ein Mitglied der IRGs, umgeben ist. Ein Verlassen der PV konnte nicht bei Vakuolen beobachtet werden, die nicht von IGTP umgeben waren, sodass womöglich ein Zusammenhang mit der Flucht aus der von GTPasen umgebenen PV und der Rolle der IFN $\gamma$  induzierten GTPasen in der *T. gondii* Abwehr besteht. Es könnte sein, dass die Instabilität der PV, erzeugt durch die IFN $\gamma$  induzierten GTPasen, vom Parasit wahrgenommen wird und dieser daraufhin die PV und die Zelle verlässt um weiteren Abwehrmechanismen zu entgehen. Die Instabilität oder der Abbau der PVM könnte durch steigende Ca<sup>2+</sup>-Mengen vom Parasiten wahrgenommen werden (Melzer et al., 2008). Normalerweise verlassen die Parasiten nach fünf bis sechs Zellteilungen durch Lyse die Wirtszelle. Der hier beobachtete „Ausstieg“ eines einzelnen Parasiten kurz nach der Infektion weicht von dem normalen Lebenszyklus der Parasiten ab. Weder kam es zu einer Vermehrung des Parasiten, noch wird die Wirtszelle lysiert. Studien zeigten, dass die so ausgestiegenen Parasiten nicht in der Lage sind, neue Wirtszellen zu infizieren (Caldas et al., 2007; Melzer et al., 2008). So könnte es sich entweder um eine aktive „Flucht“ des Parasiten handeln oder um einen weiteren durch IFN $\gamma$  induzierte GTPasen ausgelösten Abwehrmechanismus, um Zellen vor einer Infektion zu schützen.

### 5.1.2 Lokalisation von mGBP2 in der Zelle

Nach Stimulation von MEFs mit IFN $\gamma$  werden mGBPs exprimiert und es kommt zu einer vesikulären Verteilung innerhalb des Zytoplasmas. Nur mGBP5, mGBP8 und mGBP10 zeigen diese vesikuläre Verteilung nicht. Versuche, die vesikulären Strukturen genauer zu definieren blieben bisher erfolglos, es konnte keine Kolokalisation mit bestimmten Zellorganellmarkern wie Endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat, Endosomen oder intrazellulären Membrankomplexen oder mit dem Zytoskelett nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2007; Traver et al., 2011; Vestal et al., 2000). Obwohl nach *T. gondii* Infektion eine Anreicherung von Lipid Körperchen (*lipid bodies*, LB) gezeigt werden konnte (Charron und Sibley, 2002), die ebenfalls definierte vesikuläre Strukturen bilden, ähnlich der mGBPs Verteilung, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Kolokalisation von mGBP1 und den LBs nachgewiesen werden. In den letzten Jahren häuften sich die Befunde, dass es sich bei den LBs nicht nur um einfache Lipid-Vorräte handelt, es zeigte sich, dass es sich um dynamische und funktionell aktive Organellen handelt, die auch eine Rolle innerhalb der Immunabwehr übernehmen (Farese und Walther, 2009). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine andere Gruppe der IFN $\gamma$  induzierten GTPasen mit den LBs interagiert, die IRGs. Die IRGs können in zwei Gruppen unterteilt werden, den zytosolischen GKS Proteinen und den hauptsächlich Membran-gebundenen IRGM Proteinen (Howard et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Irgm1 und Irgm3 mit den LB assoziiert sind. Diese Assoziation hält offensichtlich andere IFN $\gamma$  induzierte GTPasen, wie mGBPs und GKS-IRGs davon ab, mit den LBs zu interagieren (Haldar et al., 2013). Erst wenn die LBs nicht mit IRGM Proteinen dekoriert sind, kommt es zu einer Interaktion zwischen GBPs und GKS-IRGs mit den Lipid

Körperchen (Haldar et al., 2013). Auch die Frage, wie die IRGM Proteine die GKS oder GBPs an der Bindung der PVM hindern, beantworten Haldar und Kollegen. Sie konnten die von Howard aufgestellte Hypothese belegen, dass die IRGMs als Guanin-Dissoziations-Faktoren im Zusammenhang mit den GKS agieren (Hunn et al., 2008; Papic et al., 2008). Das heißt, die IRGMs halten die GKS GTPasen im GDP-gebundenen Status, dadurch wird eine Dimerisierung der GKS verhindert, sie liegen als Monomere vor und dadurch zeigen diese eine verringerte Affinität zu Membranen auf (Haldar et al., 2013). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei den GBPs vorliegen. Auch hier könnte eine Interaktion mit den IRGMs dazu führen, dass die GBPs im GDP-gebundenen Status verweilen, auch sie könnten dann eine geringere Dimerisierungs- und Oligomerisierungsrate zeigen. Allerdings ist dies für mGBP2 nicht der Fall, WT mGBP2 zeigt im GDP-gebundenem Zustand gleiche Dimerisierungsrate wie im GTP-gebundenem Zustand (Kravets et al., 2012). Falls bei anderen mGBPs die Dimerisierungsrate in irgendeiner Form durch Protein-Interaktionen beeinflusst wird, könnte eine Assoziation mit der PVM nicht erfolgen oder verhindert werden. Des Weiteren konnten Halder und Kollegen zeigen, dass in Abwesenheit von Irgm1 und Irgm3 die LBs nicht nur mit GBPs dekoriert werden, sondern auch eine Kolokalisation zwischen den LBs und dem Adapterprotein p62/SQSTM1 zu finden ist (Haldar et al., 2013). Außerdem zeigte sich, dass in IRGM-defizienten Zellen, die Zahl der LB verringert ist. So wird vermutet, dass die IRGs die *lipid bodies* zum autophagosomalen Abbau markieren könnten. Nach Haldar und Kollegen markieren die IRGM Proteine zelleigene Organellen als „selbst“ und andere Zellorganellen, wie die PV von *T. gondii* wird dadurch als nicht-selbst markiert (*missing self*). Dadurch kommt es zu einer Markierung für den autophagosomalen Abbau der nicht-selbst Organellen, sprich der parasitären Vakuole. So könnte die Akkumulation der mGBPs an der PV nicht nur dem Transport anderer antimikrobiellen Effektormolekülen dienen, sondern auch der Markierung zum autophagosomalen Abbau. Autophagische Prozesse werden durch mGBPs beeinflusst, das konnte auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (vergleiche 4.4). Es zeigte sich, dass basale Autophagie Level verändert in mGBP2 defizienten Fibroblasten vorliegen (Abbildung 42 + Abbildung 43). Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass mGBPs mit dem Adapterprotein p62/SQSTM1 interagiert (Kim et al., 2011). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p62/SQSTM1 mit mGBP2 und mGBP1 punktuell im IFN $\gamma$  induziertem Zustand kolokalisiert (Abbildung 6). Diese Kolokalisation ist vor Infektion mit *T. gondii* bereits in Vesikel ähnlichen Strukturen zu beobachten (Abbildung 6). Nach Infektion mit *T. gondii* findet man sowohl eine Akkumulation der mGBPs als auch von p62/SQSTM1 an der PVM. Allerdings zeigen kinetische Färbestudien in dieser Arbeit, dass die Rekrutierung der mGBPs unabhängig von p62/SQSTM1 ist (Abbildung 36). Schon früh in der Kinetik ist ein mGBP Signal an der PVM zu detektieren, erst verzögert zeigt sich auch ein p62/SQSTM1 Signal an der PVM. Des Weiteren zeigte sich, dass die Rekrutierung von p62/SQSTM1 unabhängig von mGBP2 ist (Abbildung 39). Hier könnten andere mGBPs eine redundante Funktion einnehmen. Auch ein knock-down

von p62/SQSTM1 beeinflusst die Rekrutierung der mGBPs nicht (Abbildung 38). Obwohl Kim et al (2011) zeigten, dass mGBP1 positive Vesikel wichtig für den Transport von p62/SQSTM1 an die PVM ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit in p62/SQSTM1 *knock down* Zellen kein Einfluss auf die mGBP1 Lokalisation beobachtet werden (Abbildung 38).

### 5.1.3 Topologie von mGBP2 an der PV

Die Aufklärung der Topologie der mGBPs an der PV ist wichtig, um die Funktionalität der mGBP Rekrutierung weiter charakterisieren zu können. Verschiedene Topologien sind denkbar, die mGBPs könnten sich lediglich in der Nähe der PVM befinden, aber nicht mit ihr in einer Form interagieren, sie könnten an der PVM mit Hilfe lipophiler Proteinstrukturen anlagern oder sogar die PVM passieren und im Inneren der PV wirken. Einige mGBPs zeigen ein Isoprenylierungsmotiv (mGBP1, mGBP2, mGBP5), diese ist bei mGBP2 wichtig für die Assoziation mit der PVM (Degrandi et al., 2013). Aber um die Topologie an der PVM weiter zu definieren, wurden selektive Permeabilisierungsversuche durchgeführt (Methoden 3.2; Abbildung 34+Abbildung 35). Dazu wurden steigende Konzentrationen an Detergenz (Saponin) eingesetzt um selektiv die äußere Zellmembran oder innere Membrankomplexe für Antikörper durchlässig zu machen (Beckers et al., 1994). Es zeigt sich, dass auch schon durch die Fixierung mit PFA die Zellmembran für Antikörper durchlässig wurde. Dies wurde zusätzlich in einem Kontrollexperiment überprüft (nicht gezeigt). So zeigten sich im Experiment keine Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen ohne Saponin und mit geringen Konzentrationen Saponin (0,001%). Bei höheren Saponinkonzentrationen (0,02 – 0,15%) kommt es auch zu einer Permeabilisierung der PVM und der darin befindliche Parasit konnte mittels Sag1-Antikörper detektiert werden.

Zunächst zeigte der Versuch, dass bereits ohne bzw. mit geringen Saponinkonzentrationen ein mGBP2 Signal an der PV zu detektieren war. Dies lässt schließen, dass sich mGBP2 auf der zytoplasmatischen Seite der PVM befindet. Um aufzuklären, ob mGBP2 direkt mit der PVM interagiert sind weitere Versuche notwendig. Man könnte zum Beispiel eine Protease einsetzen, die mGBP2 außerhalb der PVM abbaut. Sollten Teile von mGBP2 in die PVM integrieren, wären diese vor einem proteolytischen Abbau geschützt und könnten nach Isolation der PV detektiert werden. Ähnliche Versuche konnten die Topologie von ER, Mitochondrien oder Golgi-Proteinen bestätigen, mit Hilfe der *Fluorescence Protease Protection* (FPP) Technik (Lorenz et al., 2006).

Des Weiteren zeigte der Versuch interessante Unterschiede zwischen den intermediär virulenten (Typ II) ME49 Toxoplasmen und den virulenten (Typ I) BK Stämmen. Im Falle der ME49 Toxoplasmen zeigte sich, dass auch bei geringen Saponinkonzentrationen 38% der intrazellulären Parasiten bereits ein positives Sag1 Signal aufwiesen. Dies könnte bedeuten, dass hier die PVM mGBP abhängig, durchlässig wurde. Die virulenten *T. gondii* Stämme BK und RH haben Mechanismen entwickelt, um die mGBP

Rekrutierung zu verhindern (Degrandi et al., 2007; Virreira Winter et al., 2011). Hier zeigte sich, dass ohne Saponin nur eine sehr geringe Anzahl an intrazellulären Parasiten ein Sag1 positives Signal zeigten, die PVM also nur in wenigen Fällen für den Antikörper durchlässig war. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die mGBPs an der Zerstörung der PVM beteiligt sind.

Die GBPs gehören zu der Familie der Dynamine (Praefcke and McMahon, 2004). Mitglieder der Dynaminfamilie sind unter anderem an der Abspaltung von Vesikeln beteiligt. Die mGBPs könnten ähnliche Funktionen an der PVM übernehmen, indem sie beispielsweise kleine Vesikel von der PVM ablösen und somit zur Zerstörung der PV beitragen. Während der Infektion mit ME49 Toxoplasmen kommt es zur Rekrutierung der mGBPs, diese können die PVM angreifen oder andere Effektorproteine, die die Membran auflösen, transportieren. Die PVM wird dadurch für den Antikörper durchlässig, trotz einer geringen Detergenz-Konzentration. Bei der Infektion mit den virulenten BK Toxoplasmen, wird die Rekrutierung der mGBPs durch die Virulenzfaktoren ROP16,18 und GRA15 (Taylor et al., 2006; Virreira Winter et al., 2011) verhindert. Daher können die mGBPs die PVM nicht angreifen bzw. dessen Angriff vermitteln.

Ob dieser Angriff der PVM allein auf die mGBPs zurück zu führen ist, bleibt zu klären. Denn auch die IFN $\gamma$  induzierten p47 GTPasen, die IRGs, rekrutieren nach Infektion mit ME49 Toxoplasmen an die PVM und werden durch BK/RH Effektormechanismen daran gehindert. So könnten auch die IRGs für die Disruption der PVM verantwortlich sein (Zhao et al., 2008) und die mGBPs eine andere Funktion in der Signalkaskade übernehmen. So könnten innerhalb der GBPs und der IRGs die einzelnen Proteine unterschiedliche Funktionen übernehmen, zum Beispiel könnten einige eine regulatorische, andere eine Effektor Funktion ausüben (Hunn et al., 2008; Kim et al., 2011; Traver et al., 2011; Yamamoto et al., 2012) oder eine Transportfunktion übernehmen (Haldar et al., 2013).

Unabhängig von den mGBPs und IRGs, müssen noch andere Abwehrmechanismen der Zelle die PVM angreifen. Denn nach Infektion mit BK Toxoplasmen zeigten auch ohne Rekrutierung der mGBPs oder IRGs, 30% der parasitophoren Vakuolen ein positives Signal für das Toxoplasma Oberflächenprotein Sag1. Dies bedeutet, dass möglicherweise ein komplexes Netzwerk innerhalb der Zelle zur Abwehr von *T. gondii* vorliegt, welches teilweise unabhängig von den IFN $\gamma$  induzierten GTPasen wirkt.

## 5.2 Bedingungen für die Rekrutierung von mGBPs zur PVM

Obwohl die mGBPs schon Ende der 70er Jahre beschrieben worden sind (Cheng et al., 1983; Gupta et al., 1979; Knight und Korant, 1979) und bereits lange an ihnen geforscht wird, ist immer noch unbekannt, welche Signale dazu führen, dass die mGBPs an die PV rekrutieren. Biochemische Eigenschaften, die für die Rekrutierung notwendig sind, konnten für mGBP2 beschrieben werden (Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2012), dazu zählt die Isoprenylierung am C-Terminus und die Bildung von Oligomeren.

Allerdings wurde noch kein Sensor oder Rezeptor beschrieben, der für die Rekrutierung der mGBPs nach *T. gondii* Infektion verantwortlich ist.

### 5.2.1 Die Rekrutierung von mGBP2 ist MyD88 unabhängig

Nach *T. gondii* Infektion ist die Produktion von IL-12 wichtig für den Verlauf der Infektion (Gazzinelli et al., 1993; Hunter et al., 1994; Johnson, 1992; Khan et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die IL-12 Produktion in Folge der *T. gondii* Infektion abhängig vom TLR Adaptermolekül MyD88 ist (Scanga et al., 2002). Des Weiteren zeigen MyD88<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer *T. gondii* Infektion (Melo et al., 2010; Scanga et al., 2002; Sukhumavasi et al., 2008). Da MyD88 als Adapterprotein der meisten TLRs fungiert wurde vermutet, dass auch *T. gondii*, wie andere Pathogene, mittels TLRs erkannt wird. Die TLRs übernehmen innerhalb des Immunsystems eine wichtige Rolle, in dem sie diverse PAMPs erkennen und daraufhin Signalwege aktivieren, die zur Bekämpfung der Erreger wichtig sind. So konnte die Rolle von TLR11 und TLR12 in der Erkennung von Toxoplasma Profilin beschrieben werden (Koblansky et al., 2013; Plattner et al., 2008; Yarovinsky et al., 2005). Zunächst wurde gezeigt, dass *T. gondii* Profilin TLR11 aktiviert (Yarovinsky et al., 2005) und dass TLR11<sup>-/-</sup> Mäuse nach *T. gondii* Infektion eine verringerte IL-12 Produktion und eine erhöhte Anzahl von Gehirn Zysten zeigten (Plattner et al., 2008). Dennoch reicht der TLR11<sup>-/-</sup> Phänotyp nicht aus, um den drastischen Phänotyp in der MyD88<sup>-/-</sup> Maus zu erklären. Dies konnte gelöst werden, als beschrieben wurde, dass sowohl TLR11 als auch der zuvor nicht bekannte TLR12 für die *T. gondii* Erkennung wichtig ist (Andrade et al., 2013; Koblansky et al., 2013). Da die *T. gondii* Abwehr von der Erkennung des Parasiten durch TLRs abhängig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet, ob die Aktivierung von TLRs nach Erkennung von *T. gondii*, auch zu der Rekrutierung der mGBPs zur PV führt. Dazu wurden MyD88<sup>-/-</sup> Fibroblasten (MEFs) verwendet. Es konnte kein Unterschied in der Kolokalisation zwischen mGBPs und der *T. gondii* PV zwischen den MyD88<sup>-/-</sup> Zellen und WT Zellen festgestellt werden (Abbildung 16). Dieser Versuch zeigt, dass die Erkennung von *T. gondii* durch die Toll-like Rezeptoren keinen Einfluss auf die Rekrutierung der mGBPs an die PV hat. Die Erkennung von *T. gondii* assoziierter Moleküle durch TLR11 und TLR12 erfolgt im Endosom, nachdem der Parasit im Phagolysosom abgebaut wurde.

So könnte erklärbar sein, dass die TLRs wichtig für die IL-12 Produktion und somit für den Verlauf einer *T. gondii* Infektion sind, aber dennoch keinen Einfluss auf die mGBP Rekrutierung zu intrazellulären Erregern haben. Die mGBP Rekrutierung ist ein sehr früher Abwehrmechanismus nach *T. gondii* Infektion (Degrandi et al., 2007) und könnte im Zusammenhang mit der Zerstörung der PV und der damit verbundenen Exposition des Parasiten gegenüber anderen Abwehrmechanismen in Verbindung gebracht werden (Ling et al., 2006; Zhao et al., 2008).

Ein weiteres Protein, das mit der *T. gondii* Abwehr zusammenhängt ist UNC93B1. Es ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und ist mit den endosomalen TLRs assoziiert. Die endosomalen TLRs (TLR3/7/9/11/12) werden erst nach Aktivierung vom

ER zum Endosom transportiert (Brinkmann et al., 2007; Kim et al., 2008). Zum einem ist UNC93B1 für den Transport der TLRs zum Endosom wichtig (Kim et al., 2008), zum anderem wurde eine TLR-unabhängige Rolle für das Protein beschrieben (Melo et al., 2010). UNC93B1 wurde auch mit der Präsentation von Antigenen in Zusammenhang gebracht (Tabeta et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass UNC93B1 nach *T. gondii* Infektion vom ER nicht zum Endosom, sondern zur PV des Parasiten rekrutiert (Melo et al., 2010). Es könnte vermutet werden, dass die Lokalisation von UNC93B1 damit zusammenhängt, dass das ER mit der PV assoziiert (Brinkmann et al., 2007; Tabeta et al., 2006). Dennoch scheint der Transport von UNC93B1 unabhängig von TLRs zu sein, denn ER residenten TLR9 oder Mutanten von UNC93B1 konnten nicht an der PV gefunden werden (Melo et al., 2010). Ob die Rekrutierung von UNC93B1 im Zusammenhang mit der Rekrutierung der mGBPs steht, benötigt weitere Untersuchungen. Allerdings zeigten auch Melo et al (2010) bereits, dass in IFN $\gamma$  stimulierten UNC93B1<sup>-/-</sup> Zellen die Expression und Translokation der IRG-Proteine nicht beeinflusst war. So sollte die zeitliche Abfolge der Rekrutierung von UNC93B1 und der mGBPs untersucht werden. Denkbar ist, dass die mGBPs mit anderen Effektorproteinen an die PV rekrutieren, hier die PV Membran zerstören und somit die intrazellulären Parasiten mittels anderer Effektormechanismen abgebaut werden können. Daraufhin folgt die Erkennung molekularer Strukturen durch die TLRs und die Aktivierung der anschließenden Signalkaskaden und letztendlich der Produktion von IL-12. Des Weiteren ist das rekrutierte UNC93B1 an der Präsentation von Antigenen der freigesetzten und zerstörten Parasiten beteiligt (Tabeta et al., 2006). Startet tatsächlich eine derartige Aktionskaskade mit der mGBP-abhängigen Disruption der PV, sollte in Zukunft untersucht werden, ob in mGBP defizienten Mäusen die TLR abhängige Erkennung von *T. gondii* assoziierten Strukturen, gemessen an der Produktion von IL-12, beeinträchtigt ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Präsentation von *T. gondii* assoziierten Antigenen in mGBP defizienten Mäusen verändert ist. Da verschiedene mGBPs wahrscheinlich redundante Funktionen innerhalb dieser Aktionskette übernehmen könnten, sollten Versuche in Mäusen mit multiplen mGBP *knock out*, wie von Yamamoto et al (Yamamoto et al., 2012) beschrieben, gemacht werden.

### **5.2.2 Die mGBP2 Rekrutierung ist unabhängig von Mikrotubuli und Aktinfilamenten**

Nach Infektion mit *T. gondii* kommt es auf zellulärer und molekularer Ebene zu unterschiedlichsten Manipulationen der Wirtszelle (Sibley, 2003; Sinai et al., 1997). Eine der drastischsten ist die Reorganisation des Zytoskeletts. In diesem Zusammenhang kommt es auch zu einer Relokalisation verschiedener Zellorganellen wie Mitochondrien, ER, Lysosomen und anderer Komponenten des endozytotischen und exozytotischen Weges um die PV des Parasiten herum (Coppens et al., 2006; Sinai et al., 1997).

Kurz nach *T. gondii* Infektion kommt es zu einer erhöhten Expression von  $\alpha$ -Tubulin (Nelson et al., 2008). Im Vergleich dazu werden Aktin und Aktin-verwandte Proteine des Aktinzytoskeletts herunter reguliert (Nelson et al., 2008). Auch Vimentin, ein Bestandteil der dritten Komponente des Zytoskeletts, den Intermediär-Filamenten (Wang und Stamenovic, 2002), zeigt nach Infektion mit *T. gondii* eine veränderte Lokalisation (Coppens et al., 2006; Halonen und Weidner, 1994). Vimentin hat diverse strukturgebende Funktionen als auch Funktionen innerhalb des Zellzyklus, des Lipid Metabolismus und während der Mitose (Wang und Stamenovic, 2002). Es kommt nicht nur zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, auch wird es vom Parasiten für eigene Zwecke genutzt. So konnte gezeigt werden, dass ein intaktes Wirts Zytoskelett die Zeit des Invasionsvorganges der Parasiten drastisch verkürzt (Sweeney et al., 2010). Es wird angenommen, dass wirtseigene molekulare Faktoren, mit Hilfe des Mikrotubuli Netzwerkes, an die Stelle der Infektion transportiert werden, um hier das Netzwerk zu remodellieren und den Parasiteneintritt zu ermöglichen (Sweeney et al., 2010). Auslöser für den Transport könnten vom Parasiten sezernierte Proteine sein. Zu den sezernierten Effektorproteinen von *T. gondii* gehören die Proteine der sekretorischen Organellen (Mikroneme, Rhoptrien, Dichte Granula). Es wird vermutet, dass in das Wirtszytosol sezernierte ROP (Rhoptrien Proteine) entlang von Mikrotubuli in der Wirts Zelle transportiert werden (Hakansson et al., 2001; Hunter und Sibley, 2012) und so die Genexpression im Zellkern beeinflussen können.

Aufgrund der Besonderheiten der Interaktion zwischen intrazellulären Parasiten und dem Zytoskelett des Wirtes und der beobachteten Dynamik der GFP-mGBP2 Vesikel während der Lebendzellaufnahmen (Abbildung 8 - Abbildung 12) wurde im Verlauf der Arbeit überprüft, ob die mGBP2 Vesikel Mikrotubuli abhängig an die PV des Parasiten rekrutieren. Dazu wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt.

Paclitaxel (Taxol®) bindet  $\beta$ -Tubulin und hemmt dadurch den Abbau von Mikrotubuli und stört somit die Dynamik des Mikrotubuli Auf- und Abbaus. Es wurde bereits gezeigt, dass Paclitaxel intrazelluläres Wachstum von *T. gondii* inhibiert (Estes et al., 1998) und für mGBP6 konnte gezeigt werden, dass es die Relokalisation an die PV stört (D. Degrandi, unveröffentlicht). Allerdings zeigten sich im Versuch mit GFP-mGBP2 exprimierenden Zellen keine Unterschiede in der Relokalisation von mGBP2 zwischen behandelten Zellen und unbehandelten. Gleiches gilt für die Inhibitoren Nocodazol und Tubulozol (Abbildung 17). Auch die Aktinzytoskelett-abhängigkeit wurde mit dem Aktin-Inhibitor Cytochalasin D getestet (Daten nicht gezeigt). Obwohl bisher eine Abhängigkeit der mGBP Fusion mit der PV noch nicht gezeigt werden konnte, ist eine Interaktion mit dem Zytoskelett zwecks Transports der mGBPs denkbar. Die GFP-mGBP2 Vesikel zeigten während des *live cell imaging* ausgeprägte Dynamiken zum Teil auch über große Distanzen. Für die p47 kDa GTPase Irga6 konnte gezeigt werden, dass diese in GTP-gebundener Form mit dem Golgi-Protein hook3 (Kaiser et al., 2004; Shenoy et al., 2007) interagiert. Das Golgi-Protein hook3 bindet an Mikrotubuli und vermittelt die Fusion von Salmonellen enthaltenden Phagosomen mit Lysosomen (Shotland et al., 2003). Dabei wird vermutet, dass Irga6 den Transport kontrolliert oder an der Remodellierung des

Phagosoms beteiligt sein könnte (Tiwari et al., 2009). Da auch überexprimierte mGBPs nur im IFN $\gamma$  stimulierten Zustand an die PV rekrutieren, ist es denkbar, dass Bewegungen in der Zelle mittels eines weiteren bzw. mehreren weiteren IFN $\gamma$  induzierten Transportmoleküls/Transportmoleküle stattfinden. Um die Bewegungsprozesse der mGBP Vesikel aufklären zu können, sollten *live cell imaging* Aufnahmen gemacht werden, in denen die Komponenten des Zytoskeletts und mGBP Vesikel gefärbt sind und in diesem Ansatz die Bewegung der Vesikel und der Zytoskelett-komponenten beobachtet werden. Denn wie die *live cell imaging* Aufnahmen zeigten (Abbildung 10), könnte es sein, dass die mGBP2-Vesikel gar nicht als Ganzes an die PV rekrutieren. Es scheint vielmehr so, als würden die Vesikel gebundenes mGBP2 „frei“ ins Zytosol entlassen, welches dann an der PV akkumuliert. Sodass das Maß an der Rekrutierung, kein Indiz dafür ist, ob die mGBP2 Vesikel mit dem Zytoskelett interagieren. Somit könnte die Bewegung der Vesikel durch die Zelle auch Mikrotubuli abhängig sein.

Eine Interaktion zwischen mGBP-Vesikel und Zytoskelett könnte auch über Adapterproteine vermittelt werden. Ähnliches konnte nach *Shigella flexneri* Infektion gezeigt werden. Hier wurde das Protein GEF-H1 (*guanine nucleotide exchange factor*) nach Infektion an die Stelle der Invasion rekrutiert. GEF-H1 bindet Mikrotubuli und Aktinfilamente (Krendel et al., 2002), ist involviert im Transport von endozytotischen und exozytotischen Vesikeln (Pathak und Dermardirossian, 2013) und ist wichtig für die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA (Rossman et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass GEF-H1 mit dem Immunrezeptor NOD1 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1*) nach *S. flexneri* Infektion interagiert. Dadurch kommt es zu einer Oligomerisierung von NOD1 Proteinen mittels ihrer CARD-Domänen (*caspase recruitment domain*) und einer transienten Interaktion mit RIPK2 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2*) und IKK (*inhibitor of  $\kappa$ B kinase*) die letztendlich in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B resultiert. Dadurch dient GEF-H1 als Adapter Protein und es wird vorübergehend ein „Erkennungskomplex“ ausgebildet. Auch für mGBPs wurde kürzlich gezeigt, dass sie CARD ähnliche Motive in ihrer Sequenz aufweisen (Shenoy et al., 2012) worüber sie interagieren könnten und ähnliche „Erkennungskomplexe“ ausbilden könnten. Der intrazelluläre Transport der einzelnen Bestandteile, der mGBP Vesikel oder schon der interagierenden „Erkennungskomplexe“ könnte über ein Adapterprotein wie GEF-H1 ausgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Interaktion von mGBPs mit anderen Komponenten des Zytoskeletts. Kürzlich wurden die Septine als „vierte“ Komponente des Zytoskeletts bezeichnet (Mostowy und Cossart, 2012). Septine sind GTP-bindende Proteine, die abhängig vom gebundenem Nukleotid (GMP, GDP oder GTP) hetero-oligomere Strukturen bilden können (Mendoza et al., 2002), ähnlich wie die mGBPs. Die Oligomere können wiederum Filamente bilden (Bertin et al., 2008; John et al., 2007). Anders als Aktinfilamente oder Mikrotubuli sind die Septin-Filamente nicht polar und können unterschiedlichste Strukturen bilden, neben den Filamenten auch ringförmige Strukturen (Bertin et al., 2008; John et al., 2007). Septine können mit Mikrotubuli und

Aktinfilamenten interagieren aber auch Lipidmembranen binden. Durch ihre vielfältige Form und Bindungsmöglichkeiten können Septine unterschiedlichste Funktionen erfüllen. Sie können ein Gerüst (*scaffold*) für andere Proteine bilden (Mostowy et al., 2011), sie regulieren Vesikel Transport- und Fusionsprozesse (Beites et al., 2005; Estey et al., 2010; Vega und Hsu, 2003), sind verantwortlich für Kompartimentalisierung von Zellen und bilden Diffusions Barrieren (Caudron und Barral, 2009). Besonders interessant ist ihre kürzlich beschriebene Aufgabe während der Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri*. Es konnte gezeigt werden, dass Septine einen „Käfig“ um eindringende Bakterien bilden (Mostowy et al., 2010; Mostowy et al., 2009). Die Käfig-artigen Strukturen erinnern an die Lokalisation der mGBPs um die PV von *T. gondii*.

Es bleibt zu testen, ob eine Kolokalisation zwischen den Septinen und mGBPs vorliegt. Die verschiedenen Septine erfüllen unterschiedliche Funktionen. So wurde gezeigt, dass SEPT2, aber nicht SEPT11 für die Assemblierung der Septine um intrazelluläre Bakterien wichtig ist (Mostowy et al., 2010; Mostowy et al., 2011). Eine Interaktion zwischen mGBPs und Septinen würde auch weitere Kolokalisationsergebnisse erklären. So konnte gezeigt werden, dass die Septin-Käfige um *S. flexneri* als Gerüst für die Bindung von verschiedenen Autophagie Markern dient, wie dem Adapterprotein p62 (Mostowy et al., 2010; Mostowy et al., 2011). Außerdem zeigte sich, dass ein knock down der Septine oder einzelner Autophagie relevanter Proteine (p62, ATG5, NDP52, ATG6, ATG7) die Assemblierung der Septinkäfige und der Kolokalisation mit den Autophagiemarkern verhindert wird (Mostowy et al., 2010; Mostowy et al., 2011). Die mGBPs könnten auch mit den Septinen als Struktur-gebende Einheit interagieren und daraufhin mit anderen Proteinen kolokalisieren und einen funktionellen Effektormolekülkomplex bilden.

### **5.2.3 Die mGBP Rekrutierung zur PVM von *T. gondii* ist MAPK, PKC und Ca<sup>2+</sup> unabhängig**

Schon vor Invasion der Parasiten in die Wirtszelle können extrazelluläre Parasiten oder Parasitenbestandteile verschiedene proinflammatorische Signalwege aktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* die Mitogen-aktivierten-Protein Kinase (MAPK) ERK1/2 aktiviert (Abi Abdallah et al., 2012; Kim und Denkers, 2006; Valere et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 wichtig für die *T. gondii* induzierte IL-12 Produktion sind (Kim et al., 2005; Mason et al., 2004). Interessant ist, dass die ERK1/2 Aktivierung bereits 10 min nach Infektion erfolgt (Valere et al., 2003). Da auch die Rekrutierung der mGBPs zur PV bereits 10 min nach Infektion zu beobachten ist, könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der ERK1/2 Aktivierung und der mGBP Rekrutierung an die PV bestehen. Um dieses zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz Versuche gemacht, bei denen die Zellen vor der *T. gondii* Infektion mit dem Inhibitor U0126 behandelt worden sind. Dabei blockiert der Inhibitor die katalytische Aktivität der MEK1 und MEK2 Kinasen (Favata et al., 1998).

MEK1/2 aktivieren normalerweise die im Signalweg nachfolgenden Kinasen ERK1/2 durch Phosphorylierung. Durch die ERK1/2 Phosphorylierung erfolgt die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie die Regulation der Zytokinproduktion (Cobb und Goldsmith, 1995). Wird diese Aktivierung durch U0126 inhibiert, kommt es zu einem Abbruch des Signals in der ERK-Signaltransduktionskaskade. Allerdings zeigte die Anwendung von U0126 keinen Einfluss auf die mGBP2 Rekrutierung an die PV des Parasiten, so dass die Translokation der mGBPs unabhängig von der ERK1/2 Aktivierung zu sein scheint.

Die Aktivierung nach *T. gondii* Infektion von ERK1/2 erfolgt in Abhängigkeit von der Proteinkinase C (PKC) (Masek et al., 2006), dies konnte in PKC $\beta^{-}$  Zellen gezeigt werden, in der es zu keiner Phosphorylierung von ERK1/2 nach *T. gondii* Infektion kam (Masek et al., 2006). Die Familie der PKC umfasst die Mitglieder PKC $\alpha$  und PKC $\beta$ /II. Die PKCs werden durch intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration reguliert (Parker und Murray-Rust, 2004). Die verschiedenen Enzyme sind an unterschiedlichen zellulären Vorgängen beteiligt, wie auch an Entzündungsprozessen und es konnte gezeigt werden, dass sie die MAPK Phosphorylierung in verschiedene Zelltypen beeinflussen (Yang und Kazanietz, 2003). Die Initiation der PKC Aktivität kann anhand einer Lokalisationänderung verfolgt werden, dabei wandern die Isoformen vom Zytosol zur Plasma Membran (Fronhofer et al., 2006; Kontny et al., 2000; Shinji et al., 1994). Auch die Infektion mit *T. gondii* induziert eine Translokation der PKC $\alpha$  und PKC $\beta$  vom Zytosol zur Plasmamembran (Masek et al., 2006). Der Höhepunkt der PKC Aktivierung war 5 bis 15 min nach Infektion zu beobachten (Masek et al., 2006). Auch die mGBPs akkumulieren derart schnell an der PV und es kommt zu einer Translokation vom Zytosol zur PV Membran. Daher könnte ein Zusammenhang zwischen PKC und der mGBP Rekrutierung bestehen. Um dies zu testen wurde der PKC Inhibitor Gö6976 verwendet. Der Inhibitor hemmt sowohl PKC $\alpha$  als auch PKC $\beta$  (Martiny-Baron et al., 1993). In Makrophagen wurde gezeigt, dass nach Anwendung des Inhibitors die Produktion von IL-12 nach *T. gondii* Infektion in Makrophagen verringert war. Der Inhibitor wurde wie in 4.2.3.2 beschrieben verwendet und die Lokalisation von GFP-mGBP2 nach *T. gondii* Infektion untersucht. Es zeigten sich keine Unterschiede in der GFP-mGBP2 Rekrutierung nach Anwendung des Inhibitors im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung der PKC keinen Einfluss auf die Translokation der mGBPs hat.

Sowohl die Aktivierung der PKC und damit auch die darauf folgende Aktivierung der MAP-Kinasen ist Ca<sup>2+</sup> abhängig (Masek et al., 2006). Kalzium ist ein wichtiger Regulator verschiedener zellulärer Funktionen wie Zellwachstum, Proliferation und Apoptose (zusammengefasst in (Berridge et al., 2000)). Es konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg an zytoplasmatisches Ca<sup>2+</sup> verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren kann, die während der Immunabwehr eine Rolle spielen, wie NF- $\kappa$ B oder auch die MAP-Kinasen (Dolmetsch et al., 1997; Dolmetsch et al., 1998). Obwohl Masek et al (2006) zeigen konnten, dass nach *T. gondii* Infektion sowohl PKC als auch MAPK Ca<sup>2+</sup>-abhängig aktiviert werden, ist bisher nicht viel über die Rolle von Ca<sup>2+</sup> als sekundären

Botenstoff innerhalb der Immunabwehr bekannt. Da die Aktivierung der PKC und der MAPK durch  $\text{Ca}^{2+}$  sowie die Rekrutierung der mGBPs sehr schnelle Vorgänge nach *T. gondii* Infektion sind, könnte auch ein Zusammenhang mit den intrazellulären Kalziumspiegeln und der Rekrutierung der mGBPs bestehen. So könnte  $\text{Ca}^{2+}$  als sekundärer Botenstoff möglicherweise Konformationsänderungen der mGBPs auslösen, wodurch sie aus den mGBP-Vesikeln entlassen werden und durch Exposition lipophiler Seitenketten mit der Membran der PV interagieren. Allerdings zeigten Versuche unter Kalzium-depletierten Bedingungen keine veränderte GFP-mGBP2 Lokalisation (vergleiche 4.2.3.2). Allerdings wurden in diesem Versuch GFP-mGBP2 überexprimierende Zellen verwendet. Hier könnte der Überschuss von mGBP2 dazu führen, dass die minimalen Veränderungen der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  Level ihren Einfluss nicht auswirken können. Aufgrund der Hinweise auf die Rolle des  $\text{Ca}^{2+}$  als sekundärer Botenstoff im Zusammenhang mit immunologischen Funktionen und der vielfältigen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aktivierung verschiedener Enzyme und Reaktionswege sollte ein Zusammenhang zwischen der mGBP Rekrutierung und  $\text{Ca}^{2+}$  nicht ausgeschlossen werden. Es sollten eventuell Versuche wiederholt werden, in denen nur endogenes Protein mit Hilfe eines Antikörpers gefärbt wird. Außerdem sollte das Verhältnis zwischen mGBP2-positiven und mGBP2-negativen PV prozentual bestimmt werden.

Die Infektion mit *T. gondii* löst in der Wirtszelle eine Vielzahl von Aktivierungen verschiedener Enzyme aus (Bonhomme et al., 1999). Es bleibt zu klären, ob die Rekrutierung von der Aktivierung eines anderen Effektors abhängig ist oder ob die mGBPs selbst eine Rolle als Sensor übernehmen. Kürzlich wurde beschrieben, dass in der Guanine-bindenden Region der mGBPs CARD-ähnliche Strukturen zu finden sind (Shenoy et al., 2012). CARD-Motive (*caspase activation and recruitment domain*) spielen eine wichtige Rolle in sensorischen Komplexen, den sogenannten Inflammasomen. Die Inflammasom-Proteinkomplexe erkennen Infektionen oder Schäden im Gewebe und dies endet mit der Aktivierung der Caspase-1. In Folge der Aktivierung werden Interleukin Vorläufer (pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18) gespalten und somit aktiviert und erfüllen Effektorfunktionen, aktivieren das adaptive Immunsystem und beeinflussen inflammatorische Prozesse (Davis et al., 2011; Schroder und Tschopp, 2010). Die CARD-Domänen in der Sequenz der mGBPs könnten zu einer Interaktion zwischen den mGBPs und Proteinen innerhalb eines Inflammasomkomplexes führen (Shenoy et al., 2012). So wurde beschrieben, dass mGBP5 Teil des Nlrp3 Inflammasoms ist und eine Funktion bei der Erkennung bakterieller Bestandteile nach *Salmonella typhimurium* oder *Listeria monocytogenes* Infektion hat (Shenoy et al., 2012). Diese neu beschriebene Funktion für mGBP5 als Sensor könnte erklären, warum einige mGBPs an die *T. gondii* PV rekrutieren und andere nicht. So können die nicht-rekrutierenden mGBPs eine neuartige, sensorische Funktion übernehmen und Signale weiterleiten, die dazu führen, dass andere mGBPs ihre Lokalisation verändern und möglicherweise als Transportproteine für andere antimikrobielle Effektorproteine dienen.

### 5.3 Die C-terminale Aminosäure D542 beeinflusst die Lokalisation von mGBP6

Um den Mechanismus der mGBP Rekrutierung zur PV aufklären zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit auch die Motive innerhalb der mGBPs bestimmt werden, die wichtig für die Rekrutierung zur PV von *T. gondii* sind. Für mGBP2 konnte bereits gezeigt werden, dass die C-terminale Isoprenylierung essentiell für die Relokalisation an die PV nach *T. gondii* Infektion ist (Degrandi et al., 2013). Während mGBP1, 2 und 5 ein Isoprenylierungsmotiv haben ist dies nicht bei allen rekrutierenden mGBPs der Fall. mGBP6 weist in seiner Sequenz kein Isoprenylierungsmotiv auf. Auch mGBP6 rekrutiert nach Infektion an die PV, dies kann aber im Gegensatz zu mGBP2 unabhängig von einer posttranslationalen Modifikation, wie einer Isoprenylierung sein. In dieser Arbeit wurden mGBP6 und mGBP10 verglichen. Die beiden GTPasen weisen eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit auf, sie unterscheiden sich nur in 14 Aminosäuren. Dennoch verhalten sie sich nach IFN $\gamma$ -Stimulation und *T. gondii* Infektion unterschiedlich, mGBP6 rekrutiert an die PV während mGBP10 zytoplasmatisch verteilt bleibt.

Zunächst wurde ein Fusionsprotein zwischen mGBP6 und mGBP10 hergestellt. Das Fusionsprotein mit dem N-Terminus von mGBP10 und dem C-Terminus von mGBP6 (mGBP10.1-6.2) verhielt sich nach IFN $\gamma$  Stimulation und *T. gondii* Infektion wie mGBP6 und akkumulierte an der PV (Abbildung 23). Das zeigt, dass der C-Terminus wichtig für die Rekrutierung des Proteins ist. Daraufhin wurden mGBP6 Mutations-konstrukte hergestellt, in denen eine oder mehrere Aminosäuren in der mGBP6 mutiert wurden, sodass diese wie in mGBP10 vorlagen. Die Lokalisation der Mutanten wurde mittels konfokaler Mikroskopie untersucht, dabei wurde untersucht, ob die Mutationskonstrukte nach IFN $\gamma$  Stimulation und *T. gondii* Infektion an die PV relokalisieren. Von Interesse waren die Konstrukte, die nicht mehr an die PV rekrutieren, diese mGBP6 Mutanten wiesen den Phänotyp von mGBP10 auf. Die Experimente ergaben, dass die Asparaginsäure 542 wichtig für die Rekrutierung zu sein scheint. Wurde diese Aminosäure zu einem Asparagin mutiert (D542N), wie es in mGBP10 vorliegt, war die Rekrutierung an die PV stark eingeschränkt.

Die mGBPs bestehen aus zwei Domänen, einer großen globulären Domäne (*large globular domain*, LG) am N-Terminus, die die Nukleotid Bindestellen beinhaltet, und einer C-terminalen Domäne, die aus  $\alpha$ -Helices besteht. Bisher wurde nur die Struktur für hGBP1 aufgeklärt (Prakash et al., 2000), Modelle anderer GBPs bauen auf dieser auf. Syguda et al (Syguda et al., 2012) unterteilten die C-Terminalen  $\alpha$ -Helices weiter in die der LG folgenden  $\alpha$ 7/11 Helix und der C-Terminalen  $\alpha$ 12/13 Helix (Syguda et al., 2012). Nach ihrem Modell verändert sich durch GTP Bindung die Konformation, Bindungen zwischen Aminosäuren verändern sich und hGBP1 kann Dimere bilden. Durch die Dimerisierung kommt es zu weiteren Konformationsänderungen und die Bindung zwischen der LG Domäne und der Helix  $\alpha$ 12/13 wird leicht gelöst, dadurch kann die Helix  $\alpha$ 12/13 mit einer weiteren Helix  $\alpha$ 12/13 eines weiteren Dimers in

Wechselwirkungen treten und eine Doppelwende (*coiled-coil*) ausbilden. Über diese Interaktion wird dann ein Tetramer gebildet.

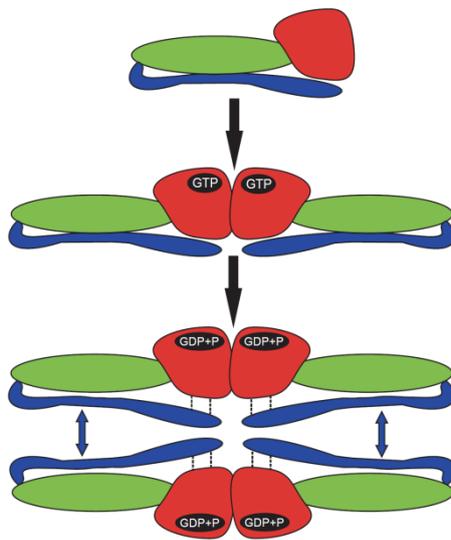


Abbildung 62: Modell der GBP Tetramerbildung nach Syguda et al. (2012). Die LG-Domäne ist in rot dargestellt, die  $\alpha$ -helicale Domäne 7/11 in grün,  $\alpha$ 12/13 in blau. Ist kein Nukleotid gebunden, liegen die GBPs als Monomere vor. Es zeigen sich wahrscheinlich zwei Bindestellen um Dimere und Tetramere zu bilden. Die erste ist in der LG-Domäne lokalisiert und die Interaktion zwischen zwei LG-Domänen ist abhängig von der GTP-Bindung. Die enzymatische Spaltung von GTP führt zu der Freilegung der  $\alpha$ 12/13 Seitenkette, diese kann dann mit weiteren  $\alpha$ 12/13 Seitenketten interagieren und Tetramere ausbilden.

Die Aminosäure, die die Rekrutierung von mGBP6 beeinflusst, D542N, liegt innerhalb der Helices  $\alpha$ 12/13 (Abbildung 63). Dadurch, dass durch die Mutation eine saure Aminosäure gegen eine polare, nicht geladene Aminosäure ausgetauscht wird, kann es zu unterschiedlichen Szenarien kommen. Es kann sein, dass die Wechselwirkungen zwischen Helix  $\alpha$ 12/13 und LG-Domäne durch den Aminosäureaustausch fester wird und daher durch eine Dimerbildung die Helix  $\alpha$ 12/13 nicht ausreichend frei gelegt werden kann. Somit können die  $\alpha$ 12/13 Helices zweier Dimere nicht mehr die Doppelwende ausbilden und dadurch keine Tetramere bilden. Oder es könnte sein, dass der Aminosäureaustausch die Bildung der Doppelwende zwischen zwei  $\alpha$ 12/13 Helices direkt betrifft, die veränderte Ladung könnte dazu führen, dass diese nicht mehr ausreichend miteinander interagieren können und letztendlich keine Tetramere mehr bilden. Dabei kann nicht nur die Bildung von homogenen Tetrameren betroffen sein, sondern auch die Ausbildung von heterogenen Oligomeren zwischen verschiedenen mGBPs. Wird die Bildung von Tetrameren verhindert, können diese nicht mehr an die PV rekrutieren, wie es auch schon für mGBP2 gezeigt worden ist (Kravets et al., 2012).

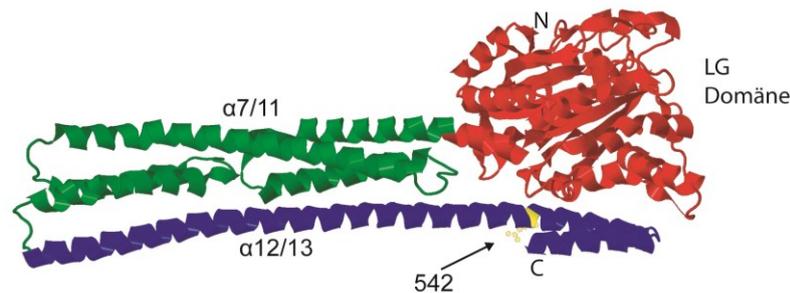


Abbildung 63: Strukturmodell von mGBP6. Die N-terminale große Domäne ist in rot dargestellt. Die  $\alpha$ -helicalen Domänen sind unterteilt in  $\alpha 7/11$  (grün) und  $\alpha 12/13$  (violett). Die Aminosäure 542 wurde gelb markiert.

Leider zeigten die entsprechenden Mutationen in mGBP10 (N542D) und mGBP2 (E548Q) keinen eindeutigen Effekt. In mGBP10 wurde die Aminosäure N542 zu einer Asparaginsäure mutiert. Hier sollte darauf hin eine Relokalisation zur PV beobachtet werden. Allerdings konnte der Versuch nicht ausreichend ausgewertet werden, da die transiente Transfektion mit dem entsprechenden Konstrukt nur schlecht funktioniert hat. Es zeigte sich in einigen Fällen eine Relokalisierung an die PV (Abbildung 28), die aber statistisch nicht ausgewertet werden konnte. Hier sollte in weiteren Experimenten das Konstrukt stabil in die Zellen transfiziert werden, um die Lokalisation nach *T. gondii* Infektion genauer analysieren zu können. In der entsprechenden mGBP2 Mutante liegt der Aminosäureaustausch E548Q vor. Diese Mutante zeigte allerdings eine Rekrutierung zur PV nach *T. gondii* Infektion, was auch auf die Isoprenylierung zurück zu führen sein kann (Abbildung 29). Allerdings zeigte die Mutante im IFN $\gamma$  stimulierten Zellen nicht die charakteristische vesikuläre Verteilung, sondern zeigte eine eher zytoplasmatische Verteilung wie es auch bei dem nicht rekrutierendem mGBP10 zu beobachten ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Tetramerbildung durch die Mutation beeinträchtigt ist. Denn eine ähnliche Verteilung zeigen auch mGBP2 Mutanten die in ihrer Nukleotidbindung beeinträchtigt sind und daraufhin keine Tetramere bilden können (Kravets et al., 2012). Folgt man dieser Argumentation, würde das heißen, dass die nicht rekrutierenden mGBPs keine Tetramere nach Infektion mit *T. gondii* ausbilden, auch dies sollte in Zukunft weiter analysiert werden, z.B. durch Interaktionsstudien mittels MFIS (*multiparameter fluorescence image spectroscopy*) Untersuchungen (Kravets et al., 2012). Ob der Aminosäureaustausch tatsächlich für eine verminderte Tetramerbildung verantwortlich ist, bleibt zu klären.

In einem Sequenzvergleich zeigen nahezu alle zur PV rekrutierenden mGBPs an der beschriebenen Stelle saure Aminosäuren sowie auch die nicht zur PV rekrutierenden mGBPs ungeladene Aminosäuren aufweisen. So besitzen die rekrutierenden mGBPs, die auf dem Chromosom 5 kodiert sind (mGBP6, mGBP9) eine Asparaginsäure und die nicht rekrutierenden mGBPs (mGBP4,8,10) ein Asparagin. Gleiches Muster ist bei den mGBPs des Chromosoms 3 zu finden, mit Ausnahme von mGBP1. Hier zeigen die

rekrutierenden mGBPs (mGBP2,3,7) eine Glutaminsäure und das nicht rekrutierende mGBP5 ein Glutamin (Abbildung 64).

mGBP1	501	NR	AE	MQ	KK	HE	ML	ME	QK	EQ	SY	QH	MK	QL	TE	KM	EQ	ER	KL	MA	EQ	II	SL	KL	QE	EQ	-----	RL	KG	GF	QNE	SL	QL	RQ	EE	IK	IK	578			
mGBP2	501	NRE	LE	KK	QK	EF	EL	MM	QK	IK	SY	QH	VK	KL	TE	KM	KD	EQ	KL	LA	EQ	II	IA	AK	LR	EQ	-----	KF	LG	EG	EN	ES	KK	LI	RE	ID	TK	578			
mGBP5	502	AQR	LE	AI	RQ	EE	QR	KA	EM	RQ	HQ	QL	---	Q	IA	LE	K	AR	VA	EQ	QV	IL	KQ	RA	QE	EA	-----	DR	IK	AE	QE	AQ	LR	AL	QQ	LQ	HM	574			
mGBP5a	390	AQR	LE	AI	RQ	EE	QR	KA	EM	RQ	HQ	QL	---	Q	IA	LE	K	AR	VA	EQ	QV	IL	KQ	RA	QGR	CP	IV	W	CL	DL	LA	ED	EG	PK	QD	LS	QK	LC	CF	GG	470
mGBP3	496	LE	LL	RQ	RQ	KE	QEQ	VM	EA	QERS	FR	EN	IA	KL	QEK	ME	SE	KE	ML	LR	DE	ML	EH	KL	KV	QE	-----	EL	LE	GF	FR	KS	DM	LN	ES	HL	LR	573			
mGBP7	502	QEL	LR	QK	QK	EL	QQ	VM	EA	QERS	YK	EN	VA	QL	HE	KM	ET	ER	KN	IL	RE	DE	KL	EH	KL	IQ	-----	DM	LE	GF	KR	KE	AM	DL	ES	QL	Q	579			
mGBP4.1	506	QDL	LR	QK	QK	EL	QQ	VM	EA	QEK	RN	KE	NL	EQ	LR	RR	KL	EQ	ER	EQ	IK	DN	ML	E	KL	TK	EQ	-----	TF	RE	EG	YK	TA	AE	EL	RR	EH	QL	583		
mGBP6	498	QEL	LR	QK	QK	EL	QQ	VM	EA	QEK	SH	KE	NL	EQ	LR	RR	KL	EQ	ER	EQ	IK	DN	ML	K	LM	KD	QK	-----	AF	LE	EG	F	KK	KA	E	M	NK	EQ	LR	575	
mGBP8	416	QDL	LR	QK	QK	EL	QQ	VM	EA	QEK	RN	KE	NL	EQ	LR	RR	KL	EQ	ER	EQ	IK	DN	ML	E	KL	TK	EQ	-----	AL	LE	EG	F	KK	KA	E	M	DG	EQ	LR	493	
mGBP9	498	QEL	LR	QK	QK	EL	QQ	VM	EA	QEK	RN	KE	NL	EQ	LR	RR	KL	MQ	ER	EQ	IK	DN	ML	E	KL	KD	QK	-----	AF	LE	EG	FT	N	KA	EE	I	NA	ER	LE	575	
mGBP10	498	QDL	LR	QK	QK	EL	QQ	VM	EA	QEK	SH	KE	NL	EQ	LR	RR	KL	MQ	ER	EQ	IK	DN	ML	K	LM	KD	QK	-----	AF	LE	EG	F	KK	KA	E	M	NK	EQ	LR	575	
mGBP11		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Abbildung 64: Ausschnitt des ClustalW Alignment ausgewählter mGBPs im Bereich, der wahrscheinlich für die Rekrutierung von mGBP6 interessant ist (542). Die mGBPs der ersten Reihen (1, 2, 3, 5 und 7) befinden sich auf Chromosom 3 und die unteren mGBPs (6, 8, 9 und 10) befinden sich auf Chromosom 5.

## 5.4 Rhoprien Proteine von *T. gondii* beeinflussen die mGBP Rekrutierung

Die Rekrutierung der mGBPs an die *T. gondii* PV ist ein wichtiger Abwehrmechanismus während der Bekämpfung der Infektion in der Maus. Dies ist belegt durch eine erhöhte Anfälligkeit von mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber einer *T. gondii* Infektion (Degrandi et al., 2013; Yamamoto et al., 2012). Sowie in Mäusen, bei denen das gesamte genomisch GBP Cluster auf Chromosom 3 deletiert wurde (Yamamoto et al., 2012). Des Weiteren zeigt sich, dass virulente *T. gondii* Stämme Mechanismen entwickelt haben, die die Rekrutierung der IFN $\gamma$  induzierten GTPasen verhindern können. Der Parasit sezerniert während der Invasion in die Zelle Effektormoleküle, die verschiedene Signalwege in der Wirtszelle beeinflussen (Hunter und Sibley, 2012). Hier spielen vor allem die Proteine der Rhoprien eine wichtige Rolle (ROP-Proteine). Dabei tragen diese zur unterschiedlichen Pathogenität der verschiedenen *T. gondii* Stämme bei. Die entsprechenden Proteine wurden mit Hilfe von *forward*-Genetik Verfahren ermittelt (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006). Dabei stellte sich heraus, dass die Virulenz hauptsächlich auf der Expression von ROP5 und ROP18 beruht (Saeij et al., 2005; Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006). In wenig virulenten *T. gondii* Stämmen, wird nur wenig ROP18 exprimiert (Taylor et al., 2006). Stellt man Typ III Toxoplasmen her, welche das Typ I ROP18 Allel exprimieren, steigt die Virulenz der zuvor nicht virulenten Parasiten (Taylor et al., 2006). ROP18 zeigt eine Seronin/Threonin Kinase Aktivität und wird während der Invasion in die Wirtszelle sezerniert. ROP5 dagegen zeigt keine katalytische Aktivität und wurde als Pseudokinase beschrieben (Reese und Boothroyd, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass ROP5 und ROP18 miteinander interagieren (Behnke et al., 2011) und ROP5 dabei eine regulatorische Rolle übernimmt (Behnke 2012), wie es auch für andere Pseudokinasen gezeigt werden konnte (Boudeau et al., 2006).

Mitglieder der p47 GTPasen (IRGs)-Familie werden von ROP18 phosphoryliert und dadurch wird ihre Akkumulation an der PV verhindert (Fentress et al., 2010; Steinfeldt et

al., 2010). Auch die mGBPs zeigen unterschiedliches Rekrutierungsverhalten, abhängig von der Virulenz des Parasiten. So zeigen sie eine Rekrutierung zur PV nach Infektion mit TypII ME49 Toxoplasmen, aber nicht nach TypI BK oder RH Toxoplasmen Infektion (Degrandi et al., 2007; Virreira Winter et al., 2011). Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob diese Unterschiede auch auf die ROP Proteine zurückzuführen sind. Dazu wurde die Sekretion der ROP Proteine mit Hilfe des Inhibitors 4-Bromophenacyl Bromid (4-BPB) gehemmt (Ravindran et al., 2009). Der genaue Wirkmechanismus des Inhibitors ist unbekannt, aber es wird vermutet, dass er die Fusion zwischen ROP-Vesikelmembran und Zellmembran verhindert (Ravindran et al., 2009). Durch den Einsatz von 4-BPB wird die Invasion der Parasiten in die Zelle gehemmt. Die Konzentration musste so gewählt werden, dass der Inhibitor noch einen Effekt zeigt, aber genügend Parasiten in die Zellen eindringen um den Versuch auswerten zu können. Der Versuch mit den Typ II ME49 Toxoplasmen zeigt bis auf die verringerte Invasion in die Zellen, keinen Einfluss auf die Rekrutierung der mGBPs an die PV (Abbildung 32). Im Versuch mit virulenten Typ I BK Toxoplasmen konnte mit steigender Inhibitorkonzentration auch eine erhöhte Menge an mGBP2-positiven PVs detektiert werden (Abbildung 33). Daraus lässt sich schließen, dass sehr wahrscheinlich ROP Proteine dafür verantwortlich sind, dass die Akkumulation der mGBPs um die PV nach Infektion mit virulenten Typ I *T. gondii* Stämmen verhindert wird. Auch für die Rekrutierung der IRGs wurde beschrieben, dass diese von ROP Proteinen nach Infektion mit virulenten Typ I *T. gondii* Stämmen verhindert wird (Khaminets et al., 2010; Zhao et al., 2009). Dabei könnte ROP18 durch die Phosphorylierung der IRGs oder auch der mGBPs die Interaktion mit der PVM verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass ROP18 in der PVM verankert ist (Labesse et al., 2009; Reese und Boothroyd, 2009). Hier könnte es zu einer vorübergehenden Interaktion zwischen ROP5 und ROP18 kommen, wodurch ROP18 vollständige katalytische Aktivität zeigt. Für verschiedene IRGs konnte gezeigt werden, dass diese durch ROP18 an einem gemeinsamen Motiv (innerhalb der *switch region I*) phosphoryliert werden (Fentress et al., 2010) und dadurch die GTPase Aktivität und die Oligomerisierung beeinträchtigt wird (Steinfeldt et al., 2010), was sich letztendlich auf die Akkumulation an der PV und dem damit verbundenen Abbau der PVM auswirkt (Fentress und Sibley, 2011). Zu klären bleibt, ob die mGBPs auch direkt von ROP18 phosphoryliert werden können, sie tragen ähnliche Motive wie die IRGs in denen es zu einer Phosphorylierung kommen könnte (Fentress et al., 2010). Die Akkumulation der mGBPs könnte auch über einen alternativen Mechanismus verhindert werden. Da die IRGs wichtig für die Organisation der mGBPs in der Zelle zu sein scheinen (Traver et al., 2011), könnte es sein, dass die IRGs Einfluss auf die Aktivierung der mGBPs haben. Durch die Phosphorylierung der IRGs wird die Oligomerbildung verhindert, das könnte auch Einfluss auf die Organisation und Aktivität der mGBPs haben. Weitere Studien sind notwendig z.B. in IRG-defizienten Mauslinien kombiniert mit massenspektrometrischen Untersuchungen, um zu klären ob die mGBPs direkt von ROP18 phosphoryliert werden oder ob ein alternativer Mechanismus die Rekrutierung der mGBPs verhindert.

## 5.5 mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen zeigen eine veränderte autophagische Aktivität

Es konnte gezeigt werden, dass viele mGBP2 enthaltende Vesikel auch positiv für den Autophagie Marker LC3 sind (Traver et al., 2011). Der Prozess der Autophagie ist ein Abbaumechanismus, während dessen große Proteinkomplexe oder ganze Zellorganellen abgebaut werden (Maiuri et al., 2007). Dies geschieht durch die Bildung einer Doppel-Membran um Teile des Zytoplasmas, die die abzubauenden Proteinkomplexe oder Zellorganellen enthalten. Die so geformten Autophagosomen fusionieren im Verlauf der Autophagie mit späten Endosomen bzw. Lysosomen, was letztendlich zum Abbau der umschlossenen Proteinkomplexe bzw. Zellorganellen führt. Dieser Mechanismus dient nicht nur zur Nährstoffversorgung während Nährstoffmangels (Hunger), sondern wurde auch beschrieben um intrazelluläre Pathogene zu beseitigen (Levine, 2005). Werden intrazelluläre Pathogene mittels Autophagie beseitigt, wird häufig auch von Xenophagie gesprochen, um den Mechanismus von der Autophagie als Nährstoffquelle unterscheiden zu können (Levine 2005). Somit könnten die GBPs eine vermittelnde Komponente darstellen, die z.B. parasitäre Strukturen detektiert und zum Abbau innerhalb der Xenophagie markiert.

Allerdings zeigen mGBP2 positive Vesikel nie ein LAMP1 Signal (Traver et al., 2011). LAMP1 ist ein Marker für späte Endosomen, sodass Traver und Kollegen daraus schließen, dass mGBP2 eine Funktion in der frühen Phase der Autophagosomen Bildung übernimmt. Um dies weitergehend zu testen, gibt es die Möglichkeit Autophagie auf verschiedene Weisen zu inhibieren, entweder durch die Verwendung Autophagie defizienter Zelllinien oder durch chemische Inhibitoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ATG5 defiziente Zellen verwendet. ATG5 ist ein wichtiges Autophagie-Protein, es sorgt für die Elongation von Autophagosom-Membranen (Youle und Narendra, 2011). Ohne ATG5 können keine Autophagosomen gebildet werden und es kann keine Autophagie stattfinden. Es wurde bereits beschrieben, dass in ATG5 defizienten Zellen die p47 IRGs vermindert exprimiert werden und größere Proteinaggregate bilden (Khaminets et al., 2010; Zhao et al., 2008). Dies konnte auch für mGBP2 beschrieben werden (diese Arbeit, und (Traver et al., 2011) und ebenso kürzlich für mGBP1 (Selleck et al., 2013). Da ATG5 wichtig für die Aktivierung von LC3 ist, kann in ATG5 defizienten Zellen keine Kolo-kalisation von LC3 und mGBP2 beobachtet werden. Außerdem zeigte sich nach *T. gondii* Infektion, dass in den ATG5-defizienten Zellen deutlich weniger mGBP2 positive parasitäre Vakuolen zu detektieren sind (Abbildung 40) auch Zhao und Kollegen beschreiben dies für die p47 GTPase Irga6 (IIGP1) (Zhao et al., 2008) und Selleck et al (2013) für mGBP1. Um zu testen, ob der Prozess abhängig vom Mechanismus der Autophagie im Allgemeinen oder spezifisch ATG5 abhängig ist, wurden verschiedene Autophagie Inhibitoren eingesetzt (Abbildung 41). Es zeigte sich, dass die Rekrutierung von mGBP2 an die PV von *T. gondii* auch unter Einfluss verschiedener Inhibitoren stattfindet, sodass die Rekrutierung Autophagie unabhängig aber ATG5 abhängig ist. Versuche, die eine

mögliche Kollokalisierung zwischen mGBP2 und ATG5 zeigen sollten, wie Immunopräzipitation oder Immunfluoreszenzfärbungen, führten aufgrund schlecht funktionierender ATG5-Antikörper nicht zum Erfolg. Für Rückschlüsse, ob die GBPs und ATG5 in einem direkten Zusammenhang stehen, wäre die Beobachtung einer Kollokalisierung zwischen GBPs und ATG5 von Interesse. Letztendlich lässt sich daraus schließen, dass ATG5 möglicherweise wichtig für die Rekrutierung der GTPasen zur PV ist und somit eine Rolle innerhalb der Pathogenabwehr übernehmen könnte. Dies wird unterstützt von den Beobachtungen, dass sich membranöse Strukturen an der Pathogen enthaltenden Vakuole anhäufen (Kim et al., 2011; Selleck et al., 2013; Zhao et al., 2008). Obwohl bekannt ist, dass mGBP2 mit Irgb6 und Irgb10 interagiert und sie abhängig voneinander an die PV rekrutieren (Yamamoto et al., 2012), wurde dies nicht für Irga6 und mGBP2 beschrieben. Die Proteine könnten entweder unabhängig voneinander oder ATG5-abhängig an die PVM rekrutieren oder es könnte eine bisher nicht beschriebene Interaktion zwischen mGBP2 und Irga6 vorliegen. Eine Kollokalisierung von mGBP1 und Irga6 in ATG5<sup>-/-</sup> Zellen wurde bereits gezeigt (Selleck et al., 2013).

Eine weitere Erklärung für die verringerte Rekrutierung von mGBP2 an die PV in den ATG5-defizienten Zellen könnte sein, dass nicht ATG5 als Protein an sich wichtig ist, sondern der Prozess der Autophagie. In dem Fall, dass Autophagie nicht stattfinden kann, könnten sich fehlerhaft gefaltete Proteine zu Aggregaten komplexieren. Dadurch könnte es zu fehlerhaften Interaktionen untereinander kommen, die dazu führen, dass die GTPasen nicht an die PV des Parasiten rekrutieren können (Selleck et al., 2013). Dieser Erklärungsansatz widerspricht allerdings den Ergebnissen nach Einsatz der Autophagie Inhibitoren (Abbildung 41). Auch nach Inhibition von Autophagie durch verschiedene chemische Inhibitoren, kam es weiterhin zu einer Rekrutierung von mGBP2 an die PV. Die unüblich großen mGBP2 Vesikel, wie sie in ATG5<sup>-/-</sup> Zellen zu beobachten waren, konnten nach Einsatz der Inhibitoren nicht beobachtet werden. Dies sollte in Zukunft genauer untersucht werden, da die Anwendung der Autophagie Inhibitoren zu unspezifischen Nebeneffekten führen könnte, die eine Interpretation der Daten erschwert. Ob die verminderte Rekrutierung tatsächlich Autophagie abhängig ist, sollte mit weiteren *knock out* Zelllinien getestet werden, die Autophagie-defizient sind. Abgesehen davon, ob der Prozess der Autophagie an sich oder eine Autophagie unabhängige Rolle für ATG5 für die Rekrutierung der GTPasen an die PV wichtig ist, zeigen die Versuche, dass sowohl die Rekrutierung der GBPs als auch der Prozess der Autophagie streng kontrolliert wird.

Einen Zusammenhang zwischen humanen GBPs und Autophagie erläuterten auch Al-Zeer und Kollegen (2013). Sie zeigten, dass hGBP1/2 nach IFN $\gamma$  Induktion wichtig für die Abwehr von *Chlamydia trachomatis* in Makrophagen ist. Dabei induziert hGBP1/2 die Fusion von Autophagosomen mit den eingeschlossenen Bakterien, wodurch es letztendlich zum Abbau der Pathogene kommt. Für *T. gondii* wurde ebenfalls nachgewiesen, dass durch IFN $\gamma$  Stimulation die Beseitigung des Parasiten durch Autophagie induziert wird (Martens et al., 2005; Yap et al., 2007). Auch im nicht infizierten Zustand konnte in Makrophagen die Induktion der Autophagie durch IFN $\gamma$

gezeigt werden (Gutierrez et al., 2004). Auch ein Zusammenhang zwischen mGBP2 und der Autophagie Induktion im nicht infizierten Zustand konnte innerhalb dieser Arbeit in ersten Pilotversuchen belegt werden (Abbildung 42). Es zeigte sich, dass im Vergleich zu WT Zellen in mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen Autophagie (gemessen anhand der LC3-II Bandenintensität) weniger stark induziert wird. Die Bandenintensität wurde mit Hilfe des Programms Image Studio (Li-Cor) gemessen und mit der jeweiligen  $\beta$ -Aktin Ladekontrolle standardisiert. Ausgewertet wurden die Proben, die mit dem Autophagie Inhibitor Bafilomycin A1 behandelt worden sind, da der Umsatz von LC3-II im nicht inhibierten Zustand zu schnell ist, um mittels Western Blot verfolgt werden zu können. Unter Einfluss von Bafilomycin A1 fusionieren die Autophagosomen nicht mit den Lysosomen, akkumulieren in der Zelle und die Menge an LC3-II als späten Autophagosomen Marker kann gemessen werden. Vergleicht man nun die Induktion von Autophagie in den WT mit den mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen (Abbildung 43), zeigt sich ein Unterschied unter Autophagie induzierten Bedingungen (Nährstoffmangel, induziert durch HBSS Medium). Die mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen zeigen deutlich weniger LC3-II, also eine geringere Autophagie Induktion unter Nährstoffmangel als die WT Zellen. Wird die Autophagie lediglich durch IFN $\gamma$  induziert, was laut Al-Zeer (2013) ausreicht, zeigt sich in den mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen ein leicht erhöhtes Level an Autophagie als in den WT Zellen. Dies könnte daran liegen, dass in mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen deregulierte Proteinmengen an mGBP1 vorliegen (Daniel Degrandi persönliche Mitteilung, diese Arbeit). Im Experiment mit humanen GBP1 und GBP2 konnten Al-Zeer und Kollegen (2013) zeigen, dass beide hGBPs an der Regulation der durch Autophagie vermittelten Beseitigung von *C. trachomatis* beteiligt sind. So könnte die Überexpression von mGBP1 in den IFN $\gamma$  stimulierten mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen zu den umgekehrten LC3-II Level im Vergleich zum WT führen. In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie die Induktion der Autophagie nach Infektion mit *T. gondii* vorliegt und ob auch der *knock out* anderer mGBPs einen Einfluss auf die Induktion von Autophagie hat.

Werden intrazelluläre Parasiten mittels des autophagischen Weges abgebaut (xenophagischer Abbau), könnte dies auch einen Einfluss auf die Antigen Präsentation haben. Sollte die Qualität und/oder Quantität der Antigen-Prozessierung und Präsentation durch den Abbau intrazellulärer Pathogene durch die Autophagie Maschinerie beeinflusst werden und mGBP2 einen Einfluss auf diesen autophagischen Abbau haben, könnten Antigen präsentierende Zellen wie mGBP2<sup>-/-</sup> Dendritische Zellen oder mGBP2<sup>-/-</sup> Makrophagen einen Defekt aufweisen. Um dies zu überprüfen sollte die Antigenprozessierung und –präsentation sowie die T-Zell-Aktivierung in entsprechenden mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen nach *T. gondii* Infektion untersucht werden.

Die IFN $\gamma$  induzierte Expression der GBPs und die IFN $\gamma$  abhängige Aktivierung der Xenophagie, impliziert einen Zusammenhang zwischen GBPs und Xenophagie. Die Interaktion der mGBPs mit p62/SQSTM1 zeigt, dass GBPs für den Transport von Proteinen an die PV wichtig sein könnten, die die PV zum Abbau markieren. So könnten die Fragen nach dem zellbiologischen Charakters der Xenophagie, welche Faktoren die Xenophagie auslösen und für die Selektivität verantwortlich sind, mit Hilfe der GBPs

geklärt werden. Die GBPs könnten innerhalb der Xenophagie als Sensor agieren, in dem sie Strukturen zum Abbau erkennen und dann mit Hilfe von Autophagie Adapterproteinen zum Abbau markieren. Diese Aufgabe könnten die GBPs als Homo-Oligomere übernehmen oder die GBPs liegen in einem Multi-Proteinkomplex vor und sind mit Hilfe anderer Proteine an der Erkennung und Markierung intrazellulärer Pathogene beteiligt.

## 5.6 mGBP2 besitzt einen antiviralen Effekt gegen MCMV

Interferon Signalwege werden u.a. durch virale Infektionen aktiviert, wodurch eine Vielzahl von IFN induzierten Proteinen exprimiert wird, die zur Bekämpfung der viralen Infektion beitragen. Zu den IFN induzierten GTPasen mit antiviraler Aktivität gehören die Mx-Proteine (Frese et al., 1995; Haller et al., 1995; Pavlovic et al., 1990; Schnorr et al., 1993; Staeheli et al., 1986; Thimme et al., 1995). Aber auch für die GBPs wurde ein antiviraler Effekt nachgewiesen. So bewiesen Anderson et al (1999), dass humanes GBP1 einen Effekt gegen das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) und Encephalomyocarditis Virus (EMCV) hat. Sie zeigten in HeLa Zellen, dass die Expression von GBP1 die Replikation von VSV und EMCV hemmt. Weiter besitzt hGBP1 eine antivirale Wirkung gegen das Influenza A Virus (IAV) (Zhu et al., 2013). Auch für mGBP2 konnte ein Effekt gegen VSV und EMCV nachgewiesen werden (Carter et al., 2005).

Im Verlauf dieser Arbeit sollte getestet werden, ob mGBP2 eine Rolle in der antiviralen Immunabwehr gegen das Cytomegalievirus (MCMV) einnimmt. Es wurden mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse mit murinem MCMV infiziert und die Infektionslast der Organe, sowie die Induktion verschiedener mGBPs in den Organlysaten infizierter Mäuse untersucht.

Zunächst zeigte sich, dass die Infektionslast der Organe sich in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen kaum von WT Mäusen unterschieden (Abbildung 44-Abbildung 47). Das heißt, nach Infektion finden sich ähnliche Mengen an Virus in den verschiedenen Organen der mGBP2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen, unabhängig davon, ob das Virus in seiner Replikation beeinträchtigt wird. Daraus lässt sich schließen, dass mGBP2 keinen Einfluss auf die Infektion der Zellen hat. Des Weiteren wurde untersucht, ob mGBP2 einen Effekt auf die Virusreplikation hat. Diese wurde daran bestimmt, wie viel replikationsfähiges Virus in den Organen nachgewiesen werden kann. Es zeigte sich, dass die Viruslast in der Milz (Abbildung 48) tendenziell erhöht ist. Die Ergebnisse der Speicheldrüse (Abbildung 49) sind in den drei Versuchen sehr divergent. Ein drastischer Phänotyp zeigt sich im zweiten Infektionsversuch, während der frühen Phasen ist hier kein Virus in der WT Maus nachzuweisen. Dieser Phänotyp konnte in den anderen Versuchen nicht wiederholt werden. Dennoch zeigt sich tendenziell eine erhöhte Virusreplikation bei den frühen Zeitpunkten der Infektion in der Speicheldrüse. Im Verlauf einer MCMV Infektion manifestiert sich das Virus in den Speicheldrüsen und kann hier auch 3-4 Wochen nach Infektion nachgewiesen werden (Krmptotic et al., 2003). Der Unterschied in der

Replikation, den man in den frühen Phasen der Infektion zwischen mGBP2<sup>-/-</sup> und WT Mäusen detektieren kann, relativiert sich im späterem Verlauf der Infektion.

Es wurde geprüft, ob die Virusreplikation mit der mGBP Expression korreliert. Dazu wurde die Induktion verschiedener mGBPs in ausgewählten Organen (Milz, Speicheldrüse, Leber und Lunge) untersucht. Es zeigte sich, dass die mGBP1 Expression in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nach MCMV Infektion dereguliert vorliegt (Abbildung 52 + Abbildung 53). Das Expressionslevel von mGBP1 in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen liegt deutlich über dem der WT Mäusen, hier ist die mGBP1 Expression nach Infektion kaum nachzuweisen. Dies wurde bereits in früheren Versuchen beobachtet (Daniel Degrandi, unveröffentlicht). Auch die mGBP3 Expression liegt in vielen der MCMV infizierten Organen konstitutiv vor und wird durch die Infektion nicht beeinflusst. Die mGBP2 Expression und die Expression der mGBP5a-Spleißvariante (Degrandi et al., 2007) werden in einigen Organen zu bestimmten Zeitpunkten induziert. So zeigt sich in der Milz eine induzierte Expression von mGBP2 und mGBP5a in den WT Mäusen zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h. Diese induzierte Expression korreliert mit der erhöhten Virusreplikation in den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass mGBP2 und mGBP5a gemeinsam einen antiviralen Effekt ausüben. Aber die antivirale Funktion könnte auch allein von mGBP2 ausgehen, denn es zeigt sich in Speicheldrüse und Lunge, dass nur mGBP2 hochreguliert wird. Zum Beispiel deutet sich in der Speicheldrüse eine Korrelation zwischen mGBP2 Expression und erhöhter Virusreplikation an. Der Western-Blot (Abbildung 52) wies zum Zeitpunkt 14d nach Infektion ein Signal für mGBP2 auf. In den mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigt sich im Versuch 2 zum Zeitpunkt 14 d eine erhöhte Virusreplikation. Ebenso in der Lunge zum Zeitpunkt 72 h nach Infektion, hier ist mGBP2 zu diesem Zeitpunkt nachweisbar (Abbildung 53). Im Versuch 2 der MCMV Infektion spiegeln sich die Unterschiede in den PFUs wider. Einer antiviralen Funktion widersprechend zeigt sich die Induktion von mGBP5a in der Leber der mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse zum Zeitpunkt 48h und 72h nach Infektion (Abbildung 53). Die induzierte Expression von mGBP5a geht einher mit erhöhten Virustiter in der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus (Abbildung 50).

Die induzierte Expression von mGBP2 in einigen Organen nach Virusinfektion, stimmt mit Ergebnissen von Zhu et al. (2013) überein. Sie konnten nachweisen, dass auch das zu mGBP2 homologe hGBP1 nach Infektion mit Influenza A (IAV) hochreguliert wird. Es bleibt zu testen, ob die Überexpression von mGBP2 *in vitro* die Replikation von MCMV hemmt, wie es für hGBP1 und IAV gezeigt werden konnte (Zhu et al., 2013). Der Mechanismus wie hGBP1 die Replikation von IAV hemmt ist noch nicht geklärt, es konnte aber dokumentiert werden, dass die GTPase Aktivität von hGBP1 für den antiviralen Effekt wichtig ist. IAV hat Mechanismen entwickelt, um dem antiviralen Effekt von hGBP1 zu umgehen. So bindet das virale Protein NS1 (*nonstructural protein 1*) hGBP1, wodurch dessen GTPase Aktivität drastisch verringert wird (Zhu et al., 2013). Ähnliches konnte auch für mGBP2 nach gewiesen werden. Hier ist die GTP-Bindung wichtig für die Wirkung gegen EMCV, aber nicht für VSV (Carter et al., 2005). Ob die GTPase Aktivität von mGBP2 auch gegen MCMV wichtig ist, könnte mit der GTPase

inaktiven mGBP2-K51A Mutante (Kravets et al., 2012) *in vitro* leicht getestet werden. Dieses Experiment würde auch weiter dazu beitragen, die Rolle von mGBP2 als antivirales Effektormolekül zu definieren.

Die teilweise zeitlich übereinstimmende, gemeinsame Induktion von mGBP2 und mGBP5a lässt vermuten, dass die mGBPs einen antiviralen Effekt kooperierend ausüben. Organspezifische Unterschiede bei der Induktion von mGBP2 und mGBP5a könnten darauf hinweisen, dass die mGBPs gewebespezifisch unterschiedliche Interaktionen untereinander aufweisen könnten.

Kürzlich konnte für mGBP5 eine Rolle in der Assemblierung des NLRP3 Inflammasoms nachgewiesen werden (Shenoy et al., 2012), welches wichtig ist, um mikrobielle „*danger*“ Signale zu erkennen und Signalwege der angeborenen Immunabwehr zu induzieren. Zwar konnten Shenoy et al. zeigen, dass mGBP5 nicht auf dsDNA reagiert, was häufig als virales „*danger*“ Signal wahrgenommen wird. Es wäre dennoch denkbar, dass erst eine Interaktion zwischen mGBP5 und mGBP2 vorliegen muss, welche dann eine Voraussetzung für eine mögliche Sensorfunktion nach Virusinfektion sein könnte. Die frühe Induktion der mGBPs korreliert mit den detektierten Unterschieden in der Virusreplikation in der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus zu den frühen Zeitpunkten der Infektion. Dabei könnte mGBP2 nicht nur als Teil eines Erkennungskomplexes dienen, es könnte auch „erkannte“ Viruspartikel für den autophagosomalen Abbau markieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, besteht ein Zusammenhang zwischen mGBP2 und Autophagie (4.3). So könnte die mGBP2 Defizienz dazu führen, dass Viruspartikel nicht bzw. vermindert in den autophagischen Abbauprozess eingeschleust werden, sodass es innerhalb der Zelle vermehrt replizieren kann und es somit zu den erhöhten Virustiter in den mGBP2<sup>-/-</sup> Organen kommt.

## 5.7 Einfluss von mGBP2 auf frühe zelluläre Immunantworten nach *T. gondii* Infektion

Nach *T. gondii* Infektion zeigen mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte Anzahl an Zysten im Gehirn sowie eine erhöhte Mortalität (Degrandi et al., 2013). Wie bereits im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, ist mGBP2 wichtig für die Bekämpfung einer *T. gondii* Infektion in den frühen Phasen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein mGBP2 Defizit sich auch auf die spätere Immunantwort im Verlauf einer *T. gondii* Infektion auswirkt. Zunächst wurde untersucht, ob schon basale Unterschiede in den Zellpopulationen der immun-relevanten Effektorzellen in Milz und Lymphknoten vorliegen (Abbildung 56). Es zeigte sich, dass der mGBP2 *knock out* keinen Einfluss auf die Frequenz der B-Zellen (B220+), T-Zellen (CD90+), Dendritische Zellen (CD11b+) oder Makrophagen (CD11c+) hat. Die Zellpopulationen unterscheiden sich zwischen WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Maus nicht. Die erhöhte Suszeptibilität der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus gegenüber einer *T. gondii* Infektion ist daher wohl nicht aufgrund eines basalen Differenzierungs-defizites in den Zellpopulationen zu erklären. Wichtig ist natürlich die Analyse der Situation nach einer *T. gondii* Infektion. Daher wurden im Verlauf dieser Arbeit die Zellpopulationen nach *T. gondii* Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

Vergangene Experimente konnten zeigen, dass die Gr1+CD11b+ Monozyten eine wichtige Rolle nach oraler Infektion mit *T. gondii* spielen (Dunay et al., 2008; Robben et al., 2005). Im Versuch zeigten sich kaum Unterschiede in diesen Zellpopulationen in der Leber und der Lunge (Abbildung 58). Allerdings konnten in den mGBP2-defizienten Mäuse verringerte Mengen an Gr1+CD11b+ Zellen in der Milz nachgewiesen werden. Ob es sich dabei um Gr1+ inflammatorische Monozyten handelt sollte in künftigen Experimenten mit zusätzlichen Oberflächenmarkern (z.B. F4/80 und CD68) geklärt werden. Um die Ergebnisse der mGBP2<sup>-/-</sup> Maus mit bereits veröffentlichten Ergebnissen (Dunay et al., 2008) vergleichen zu können, sollte in Zukunft die Infektionsmethode verändert werden. Die mGBP2-defizienten Mäuse wurden i.p. mit *T. gondii* infiziert, allerdings wurden in den Experimenten von Dunay die Mäuse oral infiziert. Da die natürliche Infektionsroute von *T. gondii* über die Nahrungsaufnahme, also durch die orale Aufnahme von Oozyten oder Gewebezysten verläuft, sollten in Zukunft auch Versuche mit mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen gemacht werden, in denen diese oral infiziert werden. Nach der oralen Infektion spielen DCs und Makrophagen in den Schleimhäuten der Lunge und der Dünndarms eine besondere Rolle. Interessant ist, ob deren Funktion durch den mGBP2 *knock out* beeinflusst wird. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nach der Infektion i.p. nicht festgestellt werden.

Des Weiteren wurden Gr1<sup>low</sup>CD11b+ Zellen ausgewertet (Abbildung 59). Hier konnte in der Milz eine verringerte Zellpopulation in den mGBP2-defizienten Tieren detektiert werden. In der Leber und Lunge (Abbildung 59) zeigen sich keine Unterschiede zwischen WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen nach *T. gondii* Infektion.

Die beobachteten Schwankungen in den CD11b+ (Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen) und CD11c+ (cDCs) Populationen sind sehr groß und nur schwer auszuwerten (Abbildung 61). So ist es wichtig in Zukunft zu untersuchen ob sich die CD11b+ oder CD11c+ Subpopulationen, die genauer analysiert werden sollten, in mGBP2-defizienten zu WT Mäusen nach *T. gondii* Infektion unterscheiden um mögliche Unterschiede statistisch abzusichern.

Mashayekhi et al (2011) konnten zeigen, dass die Resistenz von Mäusen nach *T. gondii* Infektion von einer DC-Subpopulation, den CD8 $\alpha$ + DCs und deren IL-12 Produktion abhängig ist. Die Sekretion von IL-12 führt zur Produktion von IFN $\gamma$  (Gazzinelli et al., 1993) durch verschiedene Effektorzellen, wie CD4+ / CD8+ T-Zellen und NK-Zellen (Sher et al., 1995). Da diese CD8 $\alpha$ + DC Subpopulation wichtig für den Verlauf der Infektion ist, sollte untersucht werden, ob mGBP2 einen Einfluss auf diese Zellpopulation oder auf deren Aktivierung hat.

Der Einfluss der untersuchten Zellpopulationen auf die erhöhte Suszeptibilität der mGBP2<sup>-/-</sup> Mäuse kann durch die vorliegende FACS-Experimente nicht abschließend geklärt werden. Denn die Unterschiede zwischen WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen sich erst spät im Verlauf der Infektion und die Zystenbildung beginnt erst am Tag 12. Es scheint, als hätte eine mGBP2-Defizienz keinen messbaren Einfluss auf die Frequenzen der untersuchten Zellpopulationen während der akuten Phase der Infektion.

## 5.8 Ausblick

Um die Funktionalität von mGBP2 genauer aufklären zu können, sollte zunächst die Lokalisation in der Zelle vor und nach der Infektion mit *T. gondii* genauer bestimmt werden. Mit Hilfe von *live cell imaging* sollte untersucht werden, ob die mGBP2 Vesikel tatsächlich kleiner werden und sich daraufhin mGBP2 an der PV anlagert. Es konnte beobachtet werden, dass mGBP2 positive PVs in irgendeiner Form angegriffen werden, es bleibt die Frage ob tatsächlich nur mGBP positive PVs zerstört werden. Dies sollte in Zukunft genauer untersucht werden. Wichtig für die Aufklärung der Funktionalität bleibt die Bestimmung der Topologie der einzelnen mGBPs an der PV. Dies könnte in künftigen Studien mit Hilfe einer selektiven Proteolyse oder mit Hilfe der *Fluorescence Protease Protection* (FPP) Technik (Lorenz et al., 2006) analysiert werden, um zu bestimmen ob die mGBPs lediglich um die PV herum akkumulieren (Selleck et al., 2013), in direkter Interaktion mit der PVM stehen oder sogar einzelne Domänen in die PVM eingelagert werden. Außerdem wäre es interessant, ob die unterschiedlichen rekrutierenden mGBPs sich an der PVM gleich verhalten oder Unterschiede in der Lokalisation an der PV zu detektieren sind.

Die beobachtete Vesikel Dynamik schließt weiterhin eine Assoziation mit Komponenten des Zytoskeletts nicht aus. Ob die beobachteten Bewegungen Zytoskelett abhängig sind, sollte untersucht werden. Zunächst wird es nötig sein weitere *live cell imaging* Aufnahmen unter Einfluss von Zytoskelett Inhibitoren zu analysieren. Wenn die Akkumulation der mGBPs tatsächlich unabhängig von der Vesikel Dynamik ist, in dem die Proteine die Vesikel verlassen und zur PV diffundieren, bleibt es interessant ob die Bewegung der Vesikel in der Zelle Zytoskelett abhängig sind. Auch eine mögliche Interaktion mit Septinen sollte genauer untersucht werden. Die käfigartige Umlagerung intrazellulärer Pathogene, sowie die Interaktion mit verschiedenen Proteinen, die auch mit den mGBPs kolokalisieren, machen die Septine zu spannenden möglichen Interaktionspartnern. Dabei können sie als Gerüst-gebende Komponenten dienen, die einen größeren Proteinkomplex von mGBPs und anderen Interaktionspartnern zusammenhalten. Die Identifizierung von Interaktionspartnern ist ein nächster wichtiger Schritt in der funktionellen Charakterisierung der mGBPs. Wichtig wäre zu klären, ob sich die Interaktionspartner abhängig von der Lokalisation der mGBPs in der Zelle verändern, zum Beispiel unterschiedlich in den vesikulären Strukturen vor der Infektion, auf dem Weg zur PV und an der PV sind.

Ein weiteres interessantes Feld wurde mit der Identifizierung der für die Rekrutierung wichtigen Aminosäure 542 in mGBP6 eröffnet. In zukünftigen Experimenten sollte untersucht werden, ob die Mutante D542N Veränderungen bezüglich ihrer GTPase Aktivität und im Oligomerisierungsverhalten zeigt, wie es für verschiedene mGBP2 Mutanten in der G-Domäne gezeigt werden konnte (Kravets et al., 2012). Weiterhin sollte der Unterschied zwischen PVM-rekrutierenden und nicht rekrutierenden mGBPs analysiert werden. Ob die unterschiedlichen Rekrutierungsverhalten auf unterschiedliche Tetramer- oder Oligomerbildungen zurückzuführen sind. So könnten die mGBPs

abhängig von der Art der Infektion unterschiedliche Interaktionspartner binden, wodurch die spezifischen funktionellen Eigenschaften bestimmt werden könnten.

Auch der genaue Mechanismus, wie die *T. gondii* ROP Proteine der virulenten Stämme die Assemblierung der GBPs an der PV verhindern sollte in Zukunft genauer untersucht werden. Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Phosphatsubstrat (ATP), könnte eine mögliche Phosphorylierung der mGBPs nach Infektion verfolgt werden. Interessant wäre zu klären, ob allein der Einfluss der von ROP18 phosphorylierten IRGs die Rekrutierung von mGBPs verhindern. Wie verhalten sich die mGBPs in Zellen, in denen verschiedene IRGs ausgeschaltet wurden? Mögliche redundante Funktionen der verschiedenen mGBPs könnten geklärt werden durch den Einsatz multipler knock out Zellen, wie sie vor kurzem von Yamamoto (2012) publiziert wurde. Durch Rekonstitution mit einzelnen mGBPs könnte deren genaue Funktion bestimmt werden.

Ob die mGBPs eine ähnliche Rolle wie die hGBPs im Rahmen der Xenophagie übernehmen (Al-Zeer et al., 2013) sollte näher charakterisiert werden. Ein Einfluss von mGBP2 auf die Autophagie konnte gezeigt werden, um dies genauer zu klären sollten mGBP1/2 doppel-*knock out* Zellen verwendet werden.

Weitere Untersuchungen sollten sich darauf konzentrieren zu klären, woran die mGBP2<sup>-/-</sup> Maus in der Infektion mit *T. gondii* letztendlich stirbt. Ein Hauptaugenmerk sollte hier auf die adaptive Immunantwort in der späten Phase der Infektion gelegt werden. Ob eventuell die Antigenpräsentation beeinträchtigt ist oder es zu einem Defekt bei der Differenzierungen wichtiger Zellpopulationen kommt, sollte in Zukunft aufgeklärt werden. Hier könnte man sich auf Gr1<sup>+</sup> inflammatorische Monozyten und DCs konzentrieren, die CD8α<sup>+</sup> Subpopulation konnte als besonders wichtig identifiziert werden (Mashayekhi et al., 2011). Eventuell beeinflusst der mGBP2<sup>-/-</sup> die Funktion oder die Differenzierung dieser Zellpopulationen.

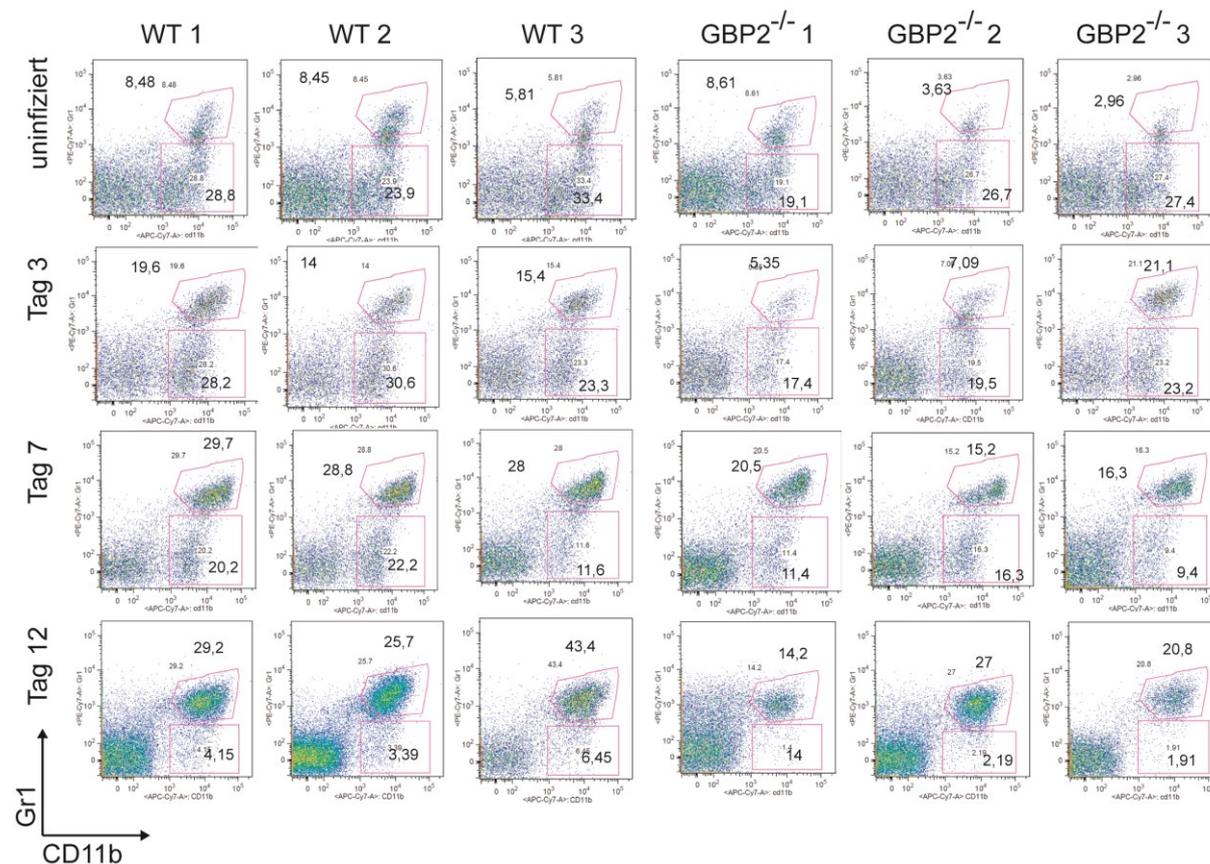
Auch der antivirale Effekt von mGBP2 sollte durch weitere Versuche verifiziert werden. Hier sollte man untersuchen, ob bestimmte Zellpopulationen durch den mGBP2-Defekt beeinträchtigt werden und ob dadurch die erhöhte Suszeptibilität erklärt werden kann. Außerdem sollten weitere Infektionsmodelle untersucht werden, wie zum Beispiel VSV oder Influenza A. Eine weitere interessante Fragestellung für die Zukunft wäre, ob auch andere mGBPs einen antiviralen Effekt zeigen. Die Aufklärung der Funktionalität der mGBPs in der Abwehr von Virusinfektionen ist eine spannende Fragestellung für zukünftige Versuche.

Künftige Arbeiten könnten sich damit befassen, die verschiedenen Funktionen der mGBPs aufzuklären. Dabei ist von besonderem Interesse, ob die nicht zur PVM rekrutierenden mGBPs eine regulatorische Funktion übernehmen und nur die rekrutierenden mGBPs eine Effektorfunktion ausüben. Von zentraler Bedeutung ist auch die Aufklärung, in welchem Maß die mGBPs und IRGs miteinander interagieren. Hierbei wird es wichtig sein aufzuklären, ob die IRGs die Lokalisation der mGBPs beeinflussen können (Traver et al., 2011) oder ob es eine andere Abhängigkeit gibt und die mGBPs die Rekrutierung der IRGs beeinflussen.

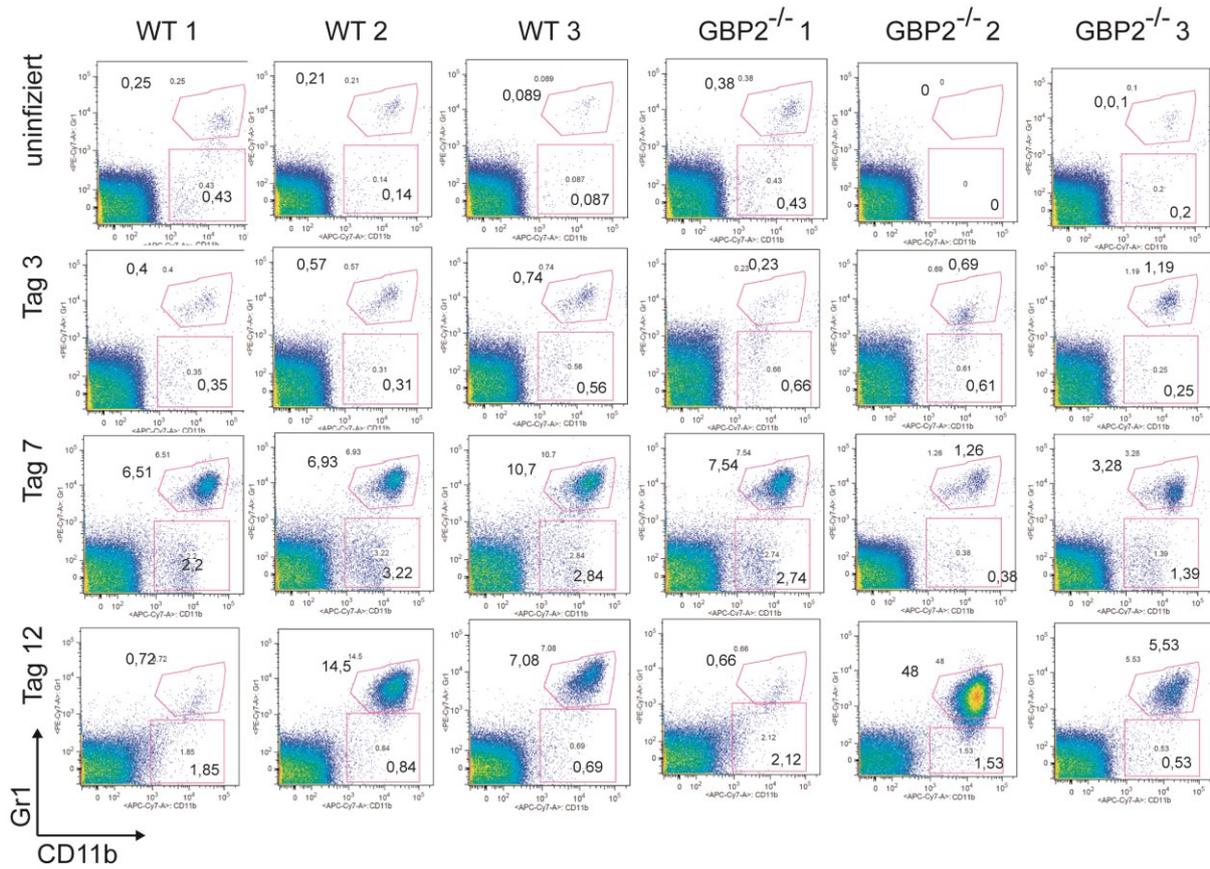


# Anhang

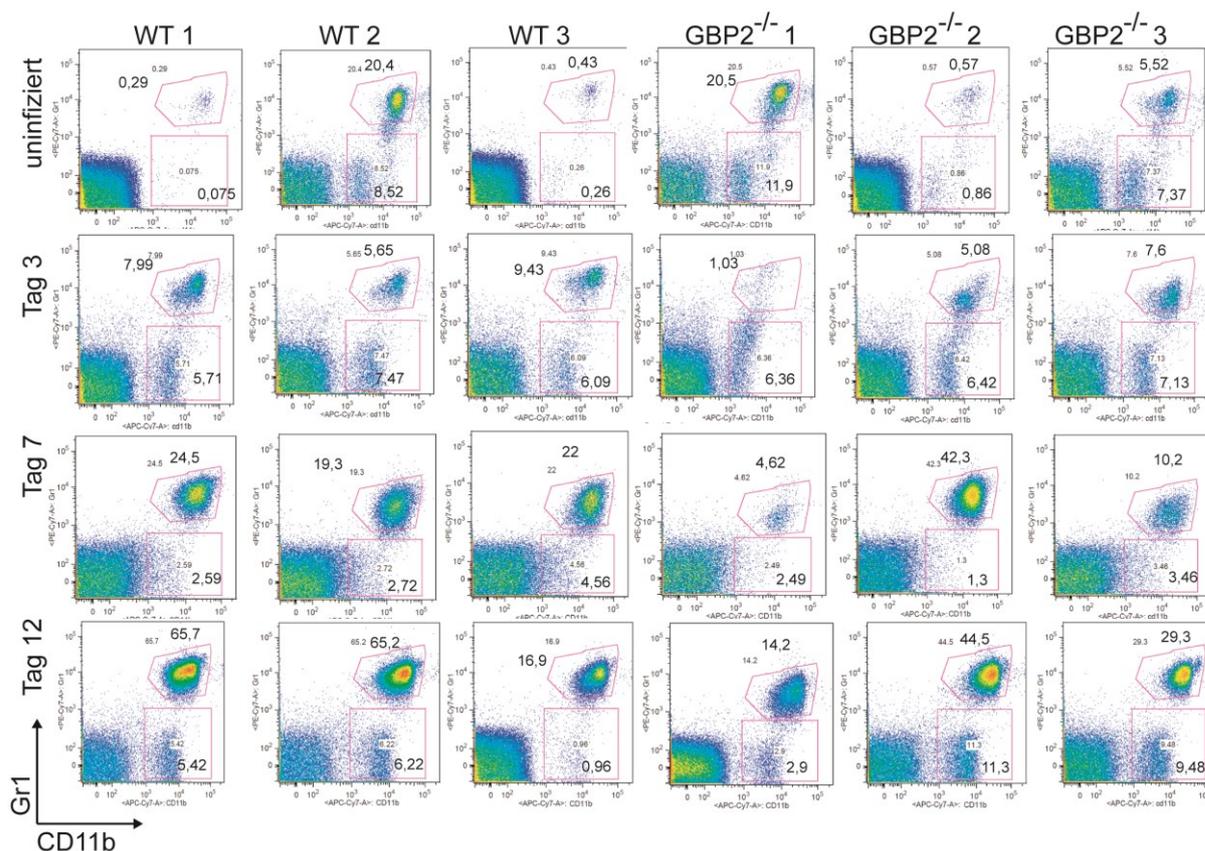
Anhang 1- Anhang 6: FACS Dot Plots nach *T. gondii* Infektion von WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen



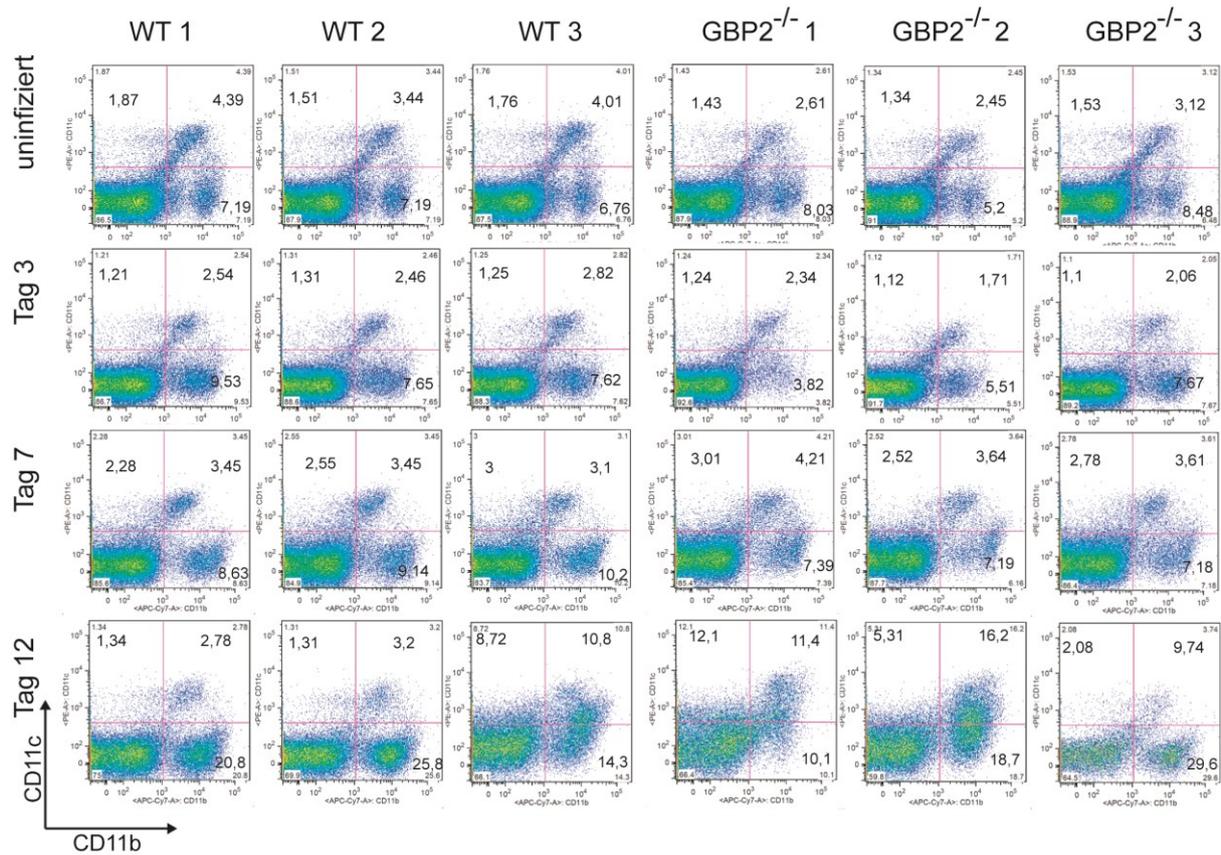
Anhang 1: Dot-Plots der FACS-Analyse der in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Organen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden Gr1<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> doppelpositive Zellen analysiert. Diese zeigen die Anzahl an Granulozyten.



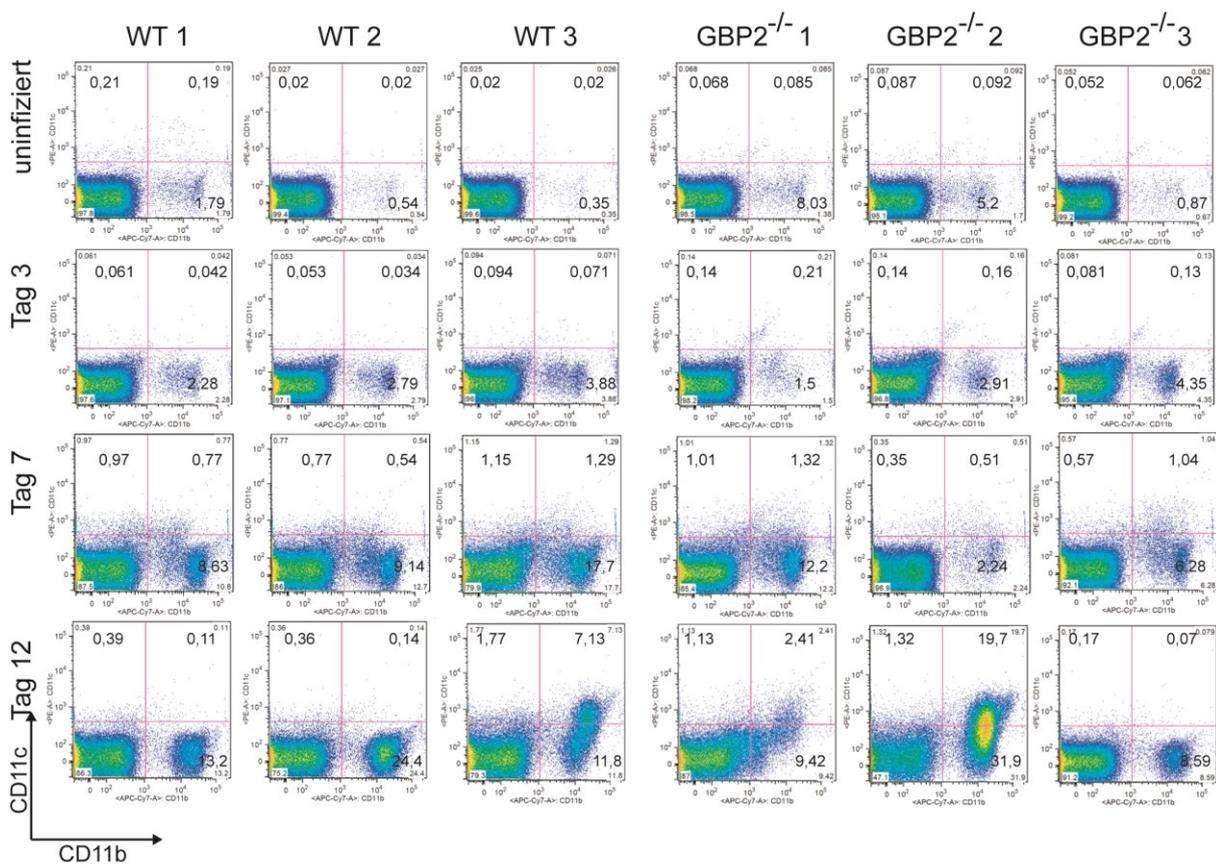
Anhang 2: Dot-Plots der FACS-Analyse der Leber in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Organen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden Gr1<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> doppelpositive Zellen analysiert. Diese zeigen die Anzahl an Granulozyten.



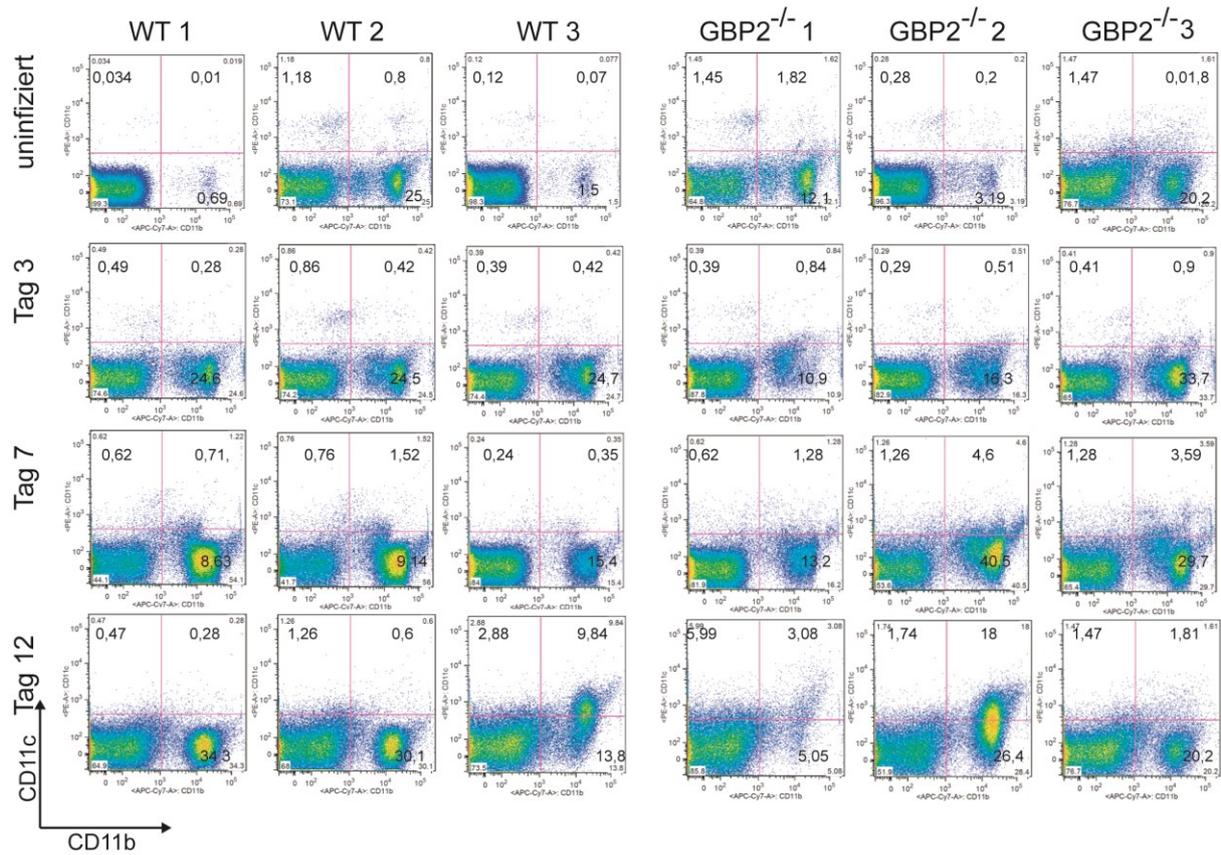
Anhang 3: Dot-Plots der FACS-Analyse der Lunge in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Organen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden Gr1<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> doppelpositive Zellen analysiert. Diese zeigen die Anzahl an Granulozyten.



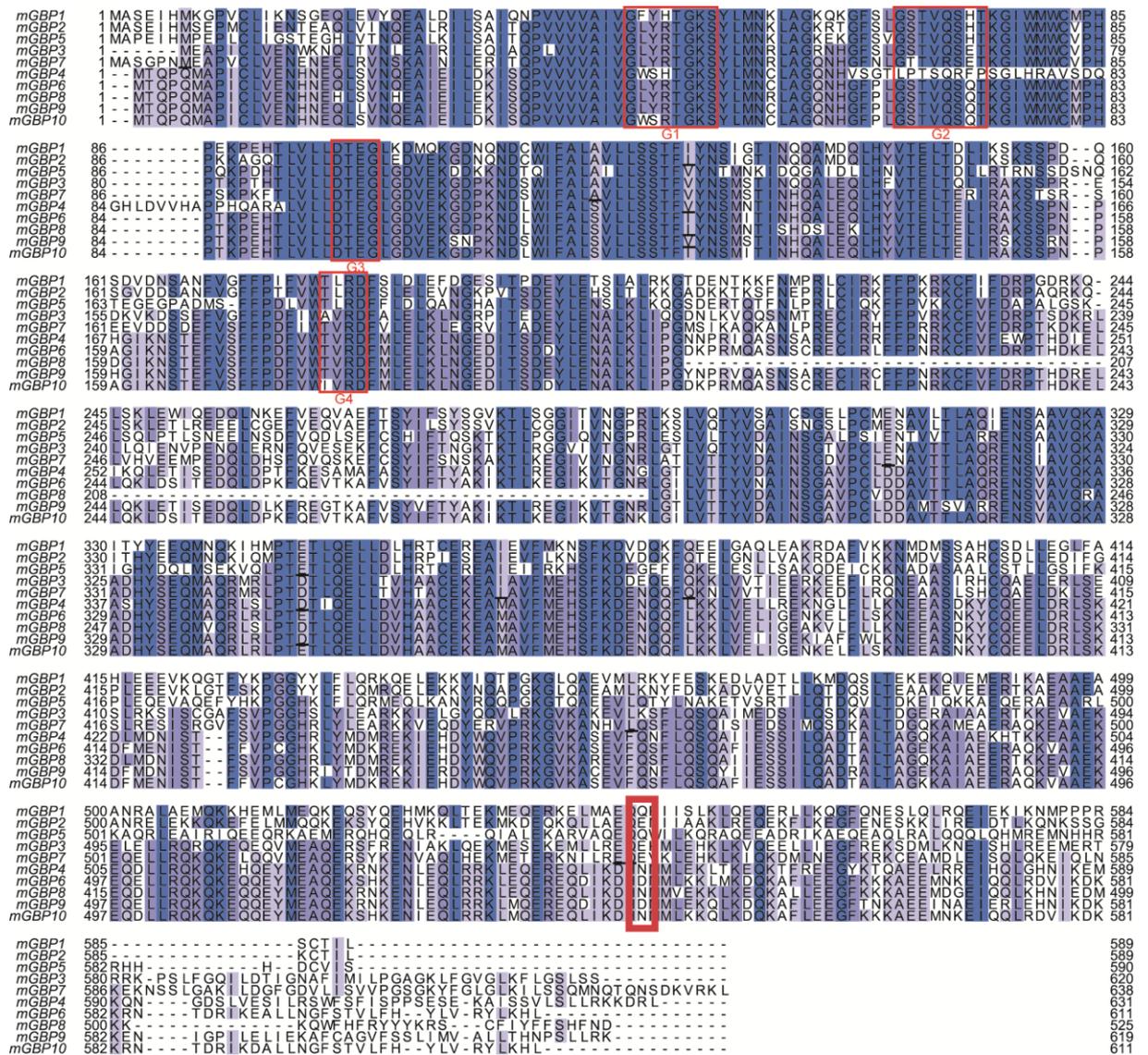
Anhang 4: Dot-Plots der FACS-Analyse der Milz WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Organen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden cDCs (single CD11c+) und CD11b+ Zellen (Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen) analysiert.



Anhang 5: Dot-Plots der FACS-Analyse der Leber in WT und  $mGBP2^{-/-}$  Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Organen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden cDCs (single CD11c+) und CD11b+ Zellen (Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen) analysiert.



Anhang 6: Dot-Plots der FACS-Analyse der Lunge in WT und mGBP2<sup>-/-</sup> Mäusen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus nicht infizierten und *T. gondii* infizierten Organen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wurden cDCs (single CD11c+) und CD11b+ Zellen (Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen) analysiert.



Anhang 7: ClustalW Alignment der mGBP Leseraster. Das Layout wurde mit der JalView Software erstellt. Basenpaare die in allen elf mGBPs identisch sind, wurden dunkelblau, ≥75% blau und ≥50% hellblau markiert. Die roten Kästen zeigen die konservierten GTP-bindende Motive: P-Loop (G1), Switch I (G2), Switch II (G3) und G4. Der breite rote Kasten zeigt die durch Mutationsanalysen identifizierte Stelle, die die mGBP6 Lokalisation beeinflusst (D542N). Nach Degrandi et al. (2007).



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde weder in der vorgelegten noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 11.10.2013

(Verena Klümpers)



## Literaturverzeichnis

- Abi Abdallah, D.S., Lin, C., Ball, C.J., King, M.R., Duhamel, G.E., and Denkers, E.Y. (2012). Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infection and immunity* 80, 768-777.
- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M.A., Camus, D., and Dubremetz, J.F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii. *Parasitology* 103 Pt 3, 321-329.
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.
- Ajioka, J.W., Fitzpatrick, J.M., and Reitter, C.P. (2001). Toxoplasma gondii genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert reviews in molecular medicine* 2001, 1-19.
- Al-Zeer, M.A., Al-Younes, H.M., Lauster, D., Abu Lubad, M., and Meyer, T.F. (2013). Autophagy restricts Chlamydia trachomatis growth in human macrophages via IFNG-inducible guanylate binding proteins. *Autophagy* 9, 50-62.
- Alberts B, J.A., Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- Alcami, A., and Koszinowski, U.H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Trends in microbiology* 8, 410-418.
- 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 pathogens* 1, e17.
- Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G.B., and Sher, A. (2000). CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nature immunology* 1, 83-87.
- Aliberti, J., Valenzuela, J.G., Carruthers, V.B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Reis e Sousa, C., Fairlamb, A., Ribeiro, J.M., and Sher, A. (2003). Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nature immunology* 4, 485-490.
- Alimi, E., Huang, S., Brazillet, M.P., and Charreire, J. (1998). Experimental autoimmune thyroiditis (EAT) in mice lacking the IFN-gamma receptor gene. *European journal of immunology* 28, 201-208.
- Anderson, P., Yip, Y.K., and Vilcek, J. (1983). Human interferon-gamma is internalized and degraded by cultured fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 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.
- Andrade, W.A., Souza Mdo, C., Ramos-Martinez, E., Nagpal, K., Dutra, M.S., Melo, M.B., Bartholomeu, D.C., Ghosh, S., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2013). Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to Toxoplasma gondii in mice. *Cell host & microbe* 13, 42-53.
- Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B., and Lanier, L.L. (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296, 1323-1326.
- Araujo, F.G., and Slifer, T. (2003). Different strains of Toxoplasma gondii induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. *Infection and immunity* 71, 4171-4174.
- Arvin A., C.-F.G., Mocarski E. (2007). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis* (Cambridge: Cambridge University Press).

- 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. *Biochimica et biophysica acta* *1217*, 257-265.
- Bach, E.A., Aguet, M., and Schreiber, R.D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual review of immunology* *15*, 563-591.
- Balthesen, M., Messerle, M., and Reddehase, M.J. (1993). Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *Journal of virology* *67*, 5360-5366.
- Barragan, A., and Sibley, L.D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in microbiology* *11*, 426-430.
- Bartlett, N.W., Buttigieg, K., Kotenko, S.V., and Smith, G.L. (2005). Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *The Journal of general virology* *86*, 1589-1596.
- Beckers, C.J., Dubremetz, J.F., Mercereau-Puijalon, O., and Joiner, K.A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *The Journal of cell biology* *127*, 947-961.
- Behnke, M.S., Khan, A., Wootton, J.C., Dubey, J.P., Tang, K., and Sibley, L.D. (2011). Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 9631-9636.
- Beites, C.L., Campbell, K.A., and Trimble, W.S. (2005). The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *The Biochemical journal* *385*, 347-353.
- 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 biology* *6*, R92.
- Bernard, A., and Boumsell, L. (1984). [Human leukocyte differentiation antigens]. *Presse Med* *13*, 2311-2316.
- Berner, V., Liu, H., Zhou, Q., Alderson, K.L., Sun, K., Weiss, J.M., Back, T.C., Longo, D.L., Blazar, B.R., Wiltrot, R.H., *et al.* (2007). IFN-gamma mediates CD4+ T-cell loss and impairs secondary antitumor responses after successful initial immunotherapy. *Nature medicine* *13*, 354-360.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* *287*, 1604-1605.
- Bertin, A., McMurray, M.A., Grob, P., Park, S.S., Garcia, G., 3rd, Patanwala, I., Ng, H.L., Alber, T., Thorner, J., and Nogales, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 8274-8279.
- Beutler, B. (2000). Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Current opinion in microbiology* *3*, 23-28.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* *7*, 1513-1523.
- Black, M.W., and Boothroyd, J.C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR *64*, 607-623.
- Blommaart, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelarova, H., and Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* *243*, 240-246.
- Bluyssen, A.R., Durbin, J.E., and Levy, D.E. (1996). ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine & growth factor reviews* *7*, 11-17.

- 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. *Annual review of immunology* *15*, 749-795.
- Bolger, G., Lapeyre, N., Rheaume, M., Kibler, P., Bousquet, C., Garneau, M., and Cordingley, M. (1999). Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis. *Antiviral research* *44*, 155-165.
- Bonhomme, A., Bouchot, A., Pezzella, N., Gomez, J., Le Moal, H., and Pinon, J.M. (1999). Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *FEMS microbiology reviews* *23*, 551-561.
- Boothroyd, J.C., and Dubremetz, J.F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature reviews Microbiology* *6*, 79-88.
- 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? *Current opinion in microbiology* *5*, 438-442.
- Bot, A., Bot, S., and Bona, C.A. (1998). Protective role of gamma interferon during the recall response to influenza virus. *Journal of virology* *72*, 6637-6645.
- Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., and Alessi, D.R. (2006). Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology* *16*, 443-452.
- Boyle, J.P., and Radke, J.R. (2009). A history of studies that examine the interactions of *Toxoplasma* with its host cell: Emphasis on in vitro models. *International journal for parasitology* *39*, 903-914.
- Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Collier, S., Coombs, G.H., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Sanderson, S.J., Wastling, J.M., *et al.* (2005). Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry* *280*, 34245-34258.
- Brasier, A.R., Tate, J.E., and Habener, J.F. (1989). Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *BioTechniques* *7*, 1116-1122.
- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *The Journal of cell biology* *177*, 265-275.
- Briscoe, J., Rogers, N.C., Witthuhn, B.A., Watling, D., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Stark, G.R., Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1996). Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *The EMBO journal* *15*, 799-809.
- Britzen-Laurent, N., Bauer, M., Berton, V., Fischer, N., Syguda, A., Reipschlager, 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.
- Brodin, P., Lakshmikanth, T., Mehr, R., Johansson, M.H., Duru, A.D., Achour, A., Salmon-Divon, M., Karre, K., Hoglund, P., and Johansson, S. (2010). Natural killer cell tolerance persists despite significant reduction of self MHC class I on normal target cells in mice. *PloS one* *5*.
- Brody, A.R., and Craighead, J.E. (1974). Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. *The Journal of infectious diseases* *129*, 677-689.
- Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R., Beckman, D.L., Blattenberger, E.A., Dubbelde, C.E., Stone, L.R., Scalzo, A.A., and Yokoyama, W.M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* *292*, 934-937.
- Bukowski, J.F., Woda, B.A., and Welsh, R.M. (1984). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *Journal of virology* *52*, 119-128.

- Burke, F., Knowles, R.G., East, N., and Balkwill, F.R. (1995). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gamma in vivo. *International journal of cancer Journal international du cancer* *60*, 115-122.
- 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.
- Butcher, B.A., Kim, L., Panopoulos, A.D., Watowich, S.S., Murray, P.J., and Denkers, E.Y. (2005). IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol* *174*, 3148-3152.
- Buzoni-Gatel, D., and Werts, C. (2006). *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends in parasitology* *22*, 448-452.
- Cai, G., Radzanowski, T., Villegas, E.N., Kastelein, R., and Hunter, C.A. (2000). Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* *165*, 2619-2627.
- Caldas, L.A., de Souza, W., and Attias, M. (2007). Calcium ionophore-induced egress of *Toxoplasma gondii* shortly after host cell invasion. *Veterinary parasitology* *147*, 210-220.
- Carey, K.L., Jongco, A.M., Kim, K., and Ward, G.E. (2004). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryotic cell* *3*, 1320-1330.
- Carlin, J.M., Borden, E.C., Sondel, P.M., and Byrne, G.I. (1987). Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Immunol* *139*, 2414-2418.
- Carruthers, V., and Boothroyd, J.C. (2007). Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current opinion in microbiology* *10*, 83-89.
- Carruthers, V.B., and Sibley, L.D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology* *31*, 421-428.
- 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. *Archives of virology* *150*, 1213-1220.
- Castellino, F., and Germain, R.N. (2006). Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annual review of immunology* *24*, 519-540.
- Caudron, F., and Barral, Y. (2009). Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Developmental cell* *16*, 493-506.
- Cesbron-Delauw, M.F. (1994). Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* *10*, 293-296.
- Chang, H.R., Grau, G.E., and Pechere, J.C. (1990). Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* *69*, 33-37.
- Chappell, C.P., and Jacob, J. (2007). Germinal-center-derived B-cell memory. *Advances in experimental medicine and biology* *590*, 139-148.
- Charron, A.J., and Sibley, L.D. (2002). Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science* *115*, 3049-3059.
- Charron, A.J., and Sibley, L.D. (2004). Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* *5*, 855-867.
- Chelbi-Alix, M.K., and Wietzerbin, J. (2007). Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie* *89*, 713-718.

- Cheng, J., Zhang, D., Zhou, C., and Marasco, W.A. (2004). Down-regulation of SHP1 and up-regulation of negative regulators of JAK/STAT signaling in HTLV-1 transformed cell lines and freshly transformed human peripheral blood CD4+ T-cells. *Leukemia research* 28, 71-82.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 260, 15834-15839.
- Cheng, Y.S., Colonno, R.J., and Yin, F.H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *The Journal of biological chemistry* 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. *Molecular and cellular biology* 11, 4717-4725.
- Chuang, T.H., and Ulevitch, R.J. (2000). Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *European cytokine network* 11, 372-378.
- Clemens, M.J., and Elia, A. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 17, 503-524.
- Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *The Journal of biological chemistry* 270, 14843-14846.
- Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D., Lusby, K.C., Tessarollo, L., Vande 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. *The Journal of experimental medicine* 194, 181-188.
- Collins, T., Pomeroy, C., and Jordan, M.C. (1993). Detection of latent cytomegalovirus DNA in diverse organs of mice. *The Journal of infectious diseases* 168, 725-729.
- 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.
- Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., and Biron, C.A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *The Journal of experimental medicine* 197, 885-898.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., and Helenius, A. (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *The Journal of cell biology* 168, 477-488.
- Daniels, K.A., Devora, G., Lai, W.C., O'Donnell, C.L., Bennett, M., and Welsh, R.M. (2001). Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *The Journal of experimental medicine* 194, 29-44.
- Darnell, J.E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- 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. *Infection and immunity* 69, 6527-6531.
- Davis, B.K., Wen, H., and Ting, J.P. (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology* 29, 707-735.
- 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., et al. (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 179, 1129-1137.

- Decker, D.J., Stewart, B.S., and Lehman, N. (2002). Major histocompatibility complex class II DOA sequences from three Antarctic seal species verify stabilizing selection on the DO locus. *Tissue antigens* *60*, 534-538.
- Decker, T., Lew, D.J., Cheng, Y.S., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (1989). Interactions of alpha- and gamma-interferon in the transcriptional regulation of the gene encoding a guanylate-binding protein. *The EMBO journal* *8*, 2009-2014.
- Decker, T., Lew, D.J., and Darnell, J.E., Jr. (1991). Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Molecular and cellular biology* *11*, 5147-5153.
- Deckert-Schluter, M., Rang, A., Weiner, D., Huang, S., Wiestler, O.D., Hof, H., and Schluter, D. (1996). Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *75*, 827-841.
- 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., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Klumpers, V., Lahme, S., Wischmann, E., Mausberg, A.K., Beer-Hammer, S., and Pfeffer, K. (2013). Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 294-299.
- Delorme-Walker, V., Abrivard, M., Lagal, V., Anderson, K., Perazzi, A., Gonzalez, V., Page, C., Chauvet, J., Ochoa, W., Volkman, N., *et al.* (2012). Toxofilin upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics, facilitating *Toxoplasma* invasion. *Journal of cell science* *125*, 4333-4342.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 15623-15628.
- Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Master, S., De Haro, S., Ponpuak, M., and Singh, S. (2009). Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy. *Current topics in microbiology and immunology* *335*, 169-188.
- Dobrowolski, J.M., and Sibley, L.D. (1996). *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* *84*, 933-939.
- Doherty, P.C., and Zinkernagel, R.M. (1975). A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* *1*, 1406-1409.
- Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* *386*, 855-858.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K., and Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* *392*, 933-936.
- Douglas, M., Finkelstein, D., and Butow, R.A. (1979). Analysis of products of mitochondrial protein synthesis in yeast: genetic and biochemical aspects. *Methods in enzymology* *56*, 58-66.
- Du, X., Poltorak, A., Wei, Y., and Beutler, B. (2000). Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *European cytokine network* *11*, 362-371.
- Dubey, J.P. (1987). *Toxoplasma gondii* cysts in placentas of experimentally infected sheep. *American journal of veterinary research* *48*, 352-353.
- Dubey, J.P. (1992). Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *The Journal of parasitology* *78*, 151-153.
- Dubey, J.P. (1997). Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of eukaryotic microbiology* *44*, 592-602.

- Dubey, J.P. (2000). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. In CRC Press.
- Dubey, J.P., Miller, N.L., and Frenkel, J.K. (1970). *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 157, 1767-1770.
- Dubey, J.P., Thayer, D.W., Speer, C.A., and Shen, S.K. (1998). Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *International journal for parasitology* 28, 369-375.
- Dubey, J.P.a.B., C.P. (1988). *Toxoplasmosis of Animals and Man*. In *Parasitology* (CRC Press), pp. 500-501.
- Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D., and Joiner, K.A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitology research* 79, 402-408.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., and Fourmaux, M.N. (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International journal for parasitology* 28, 1007-1013.
- Dubuy, H.G., Riley, F., and Showacre, J.L. (1964). Tetracycline Fluorescence in Permeability Studies of Membranes around Intracellular Parasites. *Science* 145, 163-165.
- Dumoutier, L., Tounsi, A., Michiels, T., Sommereyns, C., Kotenko, S.V., and Renauld, J.C. (2004). Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *The Journal of biological chemistry* 279, 32269-32274.
- Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306-317.
- Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., and Moscat, J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell* 13, 343-354.
- Ealick, S.E., Cook, W.J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P., and Bugg, C.E. (1991). Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science* 252, 698-702.
- El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M.N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G., *et al.* (2006). The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhopty proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6, 5773-5784.
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., and Dubremetz, J.F. (2007). ROP18 is a rhopty kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 3, e14.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Estes, R., Vogel, N., Mack, D., and McLeod, R. (1998). Paclitaxel arrests growth of intracellular *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 2036-2040.
- Estey, M.P., Di Ciano-Oliveira, C., Froese, C.D., Bejide, M.T., and Trimble, W.S. (2010). Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. *The Journal of cell biology* 191, 741-749.
- Farese, R.V., Jr., and Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855-860.
- Farrar, M.A., and Schreiber, R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual review of immunology* 11, 571-611.
- Farrell, H., Degli-Esposti, M., Densley, E., Cretney, E., Smyth, M., and Davis-Poynter, N. (2000). Cytomegalovirus MHC class I homologues and natural killer cells: an overview. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2, 521-532.
- Farrell, H.E., Degli-Esposti, M.A., and Davis-Poynter, N.J. (1999). Cytomegalovirus evasion of natural killer cell responses. *Immunological reviews* 168, 187-197.

Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., *et al.* (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 18623-18632.

Fekonja, O., Avbelj, M., and Jerala, R. (2012). Suppression of TLR signaling by targeting TIR domain-containing proteins. *Current protein & peptide science* 13, 776-788.

Fellous, M., Nir, U., Wallach, D., Merlin, G., Rubinstein, M., and Revel, M. (1982). Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 3082-3086.

Fentress, S.J., Behnke, M.S., Dunay, I.R., Mashayekhi, M., Rommereim, L.M., Fox, B.A., Bzik, D.J., Taylor, G.A., Turk, B.E., Lichti, C.F., *et al.* (2010). Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell host & microbe* 8, 484-495.

Fentress, S.J., and Sibley, L.D. (2011). The secreted kinase ROP18 defends *Toxoplasma*'s border. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 693-700.

Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156, 5-7.

Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 75-88.

Fichera, M.E., and Roos, D.S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407-409.

Fiebig, H., Behn, I., Gruhn, R., Typlt, H., Kupper, H., and Ambrosius, H. (1984). [Characterization of a series of monoclonal antibodies against human T cells]. *Allergie und Immunologie* 30, 242-250.

Fourmaux, M.N., Achbarou, A., Mercereau-Pujalon, O., Biderre, C., Briche, I., Loyens, A., Odberg-Ferragut, C., Camus, D., and Dubremetz, J.F. (1996). The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Molecular and biochemical parasitology* 83, 201-210.

Frenkel, J.K. (1970). Pursuing toxoplasma. *The Journal of infectious diseases* 122, 553-559.

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. *Journal of virology* 69, 3904-3909.

Fronhofer, V., Lennartz, M.R., and Loegering, D.J. (2006). Role of PKC isoforms in the Fc(gamma)R-mediated inhibition of LPS-stimulated IL-12 secretion by macrophages. *Journal of leukocyte biology* 79, 408-415.

Galvan Ramirez, M.L., Castillo-de-Leon, Y., Espinoza-Oliva, M., Bojorques-Ramos, M.C., Rodriguez-Perez, L.R., Bernal Redondo, R., Canedo-Solares, I., Espinoza Lopez, L., and Correa, D. (2006). Acute infection of *Toxoplasma gondii* and cytomegalovirus reactivation in a pediatric patient receiving liver transplant. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 8, 233-236.

Galvan Ramirez, M.L., Covarrubias, X., Rodriguez, R., Troyo, R., Alfaro, N., and Correa, D. (2005). *Toxoplasma gondii* antibodies in Mexican blood donors. *Transfusion* 45, 281-282.

Garcia-Sastre, A., Durbin, R.K., Zheng, H., Palese, P., Gertner, R., Levy, D.E., and Durbin, J.E. (1998). The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *Journal of virology* 72, 8550-8558.

Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., and Sher, A. (1993). Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infectious agents and disease* 2, 139-149.

Germain, M., Nguyen, A.P., Le Grand, J.N., Arbour, N., Vanderluit, J.L., Park, D.S., Opferman, J.T., and Slack, R.S. (2011). MCL-1 is a stress sensor that regulates autophagy in a developmentally regulated manner. *The EMBO journal* 30, 395-407.

- 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. *Eukaryotic cell* 6, 73-83.
- 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.
- Gilman A, G.L., Hardman JG, Limbird LE (2001). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.
- Golab, J., Zagozdzon, Stoklosal, T., Kaminski, R., Kozar, K., and Jakobisiak, M. (2000). Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far? *Immunology letters* 72, 153-157.
- Goldfine, H., and Wadsworth, S.J. (2002). Macrophage intracellular signaling induced by Listeria monocytogenes. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 1335-1343.
- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., and Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nature immunology* 11, 681-688.
- Goodridge, H.S., Harnett, W., Liew, F.Y., and Harnett, M.M. (2003). Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses. *Immunology* 109, 415-425.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 277, 6080-6087.
- Gordon, P.B., and Seglen, P.O. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 151, 40-47.
- 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). *The EMBO journal* 13, 1591-1600.
- Griffiths, P.D., and Grundy, J.E. (1987). Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *The Biochemical journal* 241, 313-324.
- Groettrup, M., van den Broek, M., Schwarz, K., Macagno, A., Khan, S., de Giuli, R., and Schmidtke, G. (2001). Structural plasticity of the proteasome and its function in antigen processing. *Critical reviews in immunology* 21, 339-358.
- Guenzi, E., Topolt, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jorg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmle, M., *et al.* (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *The EMBO journal* 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. *The EMBO journal* 22, 3772-3782.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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 evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The EMBO journal* 20, 3132-3144.
- Haldar, A.K., Saka, H.A., Piro, A.S., Dunn, J.D., Henry, S.C., Taylor, G.A., Frickel, E.M., Valdivia, R.H., and Coers, J. (2013). IRG and GBP host resistance factors target aberrant, "non-self" vacuoles characterized by the missing of "self" IRGM proteins. *PLoS pathogens* 9, e1003414.

Haller, O., Frese, M., Rost, D., Nuttall, P.A., and Kochs, G. (1995). Tick-borne thogoto virus infection in mice is inhibited by the orthomyxovirus resistance gene product Mx1. *Journal of virology* **69**, 2596-2601.

Haller, O., and Kochs, G. (2011). Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **31**, 79-87.

Halonen, S.K., and Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma parasitophorous* vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *The Journal of eukaryotic microbiology* **41**, 65-71.

Hasan, M., Krmpotic, A., Ruzsics, Z., Bubic, I., Lenac, T., Halenius, A., Loewendorf, A., Messerle, M., Hengel, H., Jonjic, S., *et al.* (2005). Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. *Journal of virology* **79**, 2920-2930.

Hassanain, H.H., Chon, S.Y., and Gupta, S.L. (1993). Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *The Journal of biological chemistry* **268**, 5077-5084.

Hengel, H., Esslinger, C., Pool, J., Goulmy, E., and Koszinowski, U.H. (1995). Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *The Journal of general virology* **76 ( Pt 12)**, 2987-2997.

Hengel, H., Lucin, P., Jonjic, S., Ruppert, T., and Koszinowski, U.H. (1994). Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *Journal of virology* **68**, 289-297.

Hertzog, P., Forster, S., and Samarajiwa, S. (2011). Systems biology of interferon responses. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **31**, 5-11.

Hilton, D.J., Richardson, R.T., Alexander, W.S., Viney, E.M., Willson, T.A., Sprigg, N.S., Starr, R., Nicholson, S.E., Metcalf, D., and Nicola, N.A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 114-119.

Hissong, B.D., and Carlin, J.M. (1997). Potentiation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA in human mononuclear phagocytes by lipopolysaccharide and interleukin-1. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **17**, 387-393.

Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., and Reth, M. (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* **343**, 760-762.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**, 3749-3752.

Howard, J.C., Hunn, J.P., and Steinfeldt, T. (2011). The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Current opinion in microbiology* **14**, 414-421.

Hoyvik, H., Gordon, P.B., and Seglen, P.O. (1986). Use of a hydrolysable probe, [<sup>14</sup>C]lactose, to distinguish between pre-lysosomal and lysosomal steps in the autophagic pathway. *Experimental cell research* **166**, 1-14.

Hu, G., and Barnes, B.J. (2006). Interferon regulatory factor-5-regulated pathways as a target for colorectal cancer therapeutics. *Expert review of anticancer therapy* **6**, 775-784.

Hu, K., Roos, D.S., and Murray, J.M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of cell biology* **156**, 1039-1050.

Hu, X., Chakravarty, S.D., and Ivashkiv, L.B. (2008). Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunological reviews* **226**, 41-56.

- Hudson, J.B. (1979). The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Archives of virology* 62, 1-29.
- 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*. *The EMBO journal* 27, 2495-2509.
- Hunter, C.A., and Remington, J.S. (1995). The role of IL12 in toxoplasmosis. *Research in immunology* 146, 546-552.
- Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature reviews Microbiology* 10, 766-778.
- Hunter, C.A., Subauste, C.S., Van Cleave, V.H., and Remington, J.S. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infection and immunity* 62, 2818-2824.
- Hurley, J.H., Lee, S., and Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *The Biochemical journal* 399, 361-372.
- Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in genetics : TIG* 11, 69-74.
- Iordanov, M.S., Ryabinina, O.P., Wong, J., Dinh, T.H., Newton, D.L., Rybak, S.M., and Magun, B.E. (2000). Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis. *Cancer research* 60, 1983-1994.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.
- J., M.D.J.a.V. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in biochemical sciences* 24, 109-115.
- Janeway CA, T.P., Walport M and Shlomchik MJ (2001). *Immunobiology* 5th Edition.
- John, C.M., Hite, R.K., Weirich, C.S., Fitzgerald, D.J., Jawhari, H., Faty, M., Schlapfer, D., Kroschewski, R., Winkler, F.K., Walz, T., *et al.* (2007). The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *The EMBO journal* 26, 3296-3307.
- Johnson, L.L. (1992). SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infection and immunity* 60, 3719-3724.
- Joiner, K.A., Beckers, C.J., Bermudes, D., Ossorio, P.N., Schwab, J.C., and Dubremetz, J.F. (1994). Structure and function of the parasitophorous vacuole membrane surrounding *Toxoplasma gondii*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 730, 1-6.
- Joiner, K.A., Fuhrman, S.A., Miettinen, H.M., Kasper, L.H., and Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249, 641-646.
- Jones, J.L., and Dubey, J.P. (2012). Foodborne toxoplasmosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55, 845-851.
- Jones, J.L., Muccioli, C., Belfort, R., Jr., Holland, G.N., Roberts, J.M., and Silveira, C. (2006). Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. *Emerging infectious diseases* 12, 582-587.
- Jones, T.C., and Hirsch, J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *The Journal of experimental medicine* 136, 1173-1194.
- Jones, T.C., Yeh, S., and Hirsch, J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *The Journal of experimental medicine* 136, 1157-1172.

- 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. *Journal of cell science* *117*, 1747-1756.
- Kariyawasam, H.H., and Robinson, D.S. (2006). The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Seminars in respiratory and critical care medicine* *27*, 117-127.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine* *13*, 460-469.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* *11*, 373-384.
- Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1991). The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS letters* *285*, 194-198.
- Khabar, K.S., Dhalla, M., Siddiqui, Y., Zhou, A., Al-Ahdal, M.N., Der, S.D., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2000). Effect of deficiency of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, on antiviral resistance in the presence or absence of ribonuclease L: HSV-1 replication is particularly sensitive to deficiency of the major IFN-mediated enzymes. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* *20*, 653-659.
- Khabar, K.S., and Young, H.A. (2007). Post-transcriptional control of the interferon system. *Biochimie* *89*, 761-769.
- 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., *et al.* (2010). Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cellular microbiology* *12*, 939-961.
- Khan, I.A., Matsuura, T., and Kasper, L.H. (1994). Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infection and immunity* *62*, 1639-1642.
- Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Bradfield, C.J., and MacMicking, J.D. (2012). IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell host & microbe* *12*, 432-444.
- 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, J.Y., and Ozato, K. (2009). The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. *J Immunol* *182*, 2131-2140.
- Kim, K., and Weiss, L.M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International journal for parasitology* *34*, 423-432.
- Kim, K., and Weiss, L.M. (2008). *Toxoplasma*: the next 100years. *Microbes and infection / Institut Pasteur* *10*, 978-984.
- Kim, L., Del Rio, L., Butcher, B.A., Mogensen, T.H., Paludan, S.R., Flavell, R.A., and Denkers, E.Y. (2005). p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. *J Immunol* *174*, 4178-4184.
- Kim, L., and Denkers, E.Y. (2006). *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *Journal of cell science* *119*, 2119-2126.
- Kim, Y.M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* *452*, 234-238.
- Kissinger, J.C., Gajria, B., Li, L., Paulsen, I.T., and Roos, D.S. (2003). ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic acids research* *31*, 234-236.
- Klotman, M.E., Henry, S.C., Greene, R.C., Brazy, P.C., Klotman, P.E., and Hamilton, J.D. (1990). Detection of mouse cytomegalovirus nucleic acid in latently infected mice by in vitro enzymatic amplification. *The Journal of infectious diseases* *161*, 220-225.

- Knight, E., Jr., and Korant, B.D. (1979). Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 1824-1827.
- Knight, Z.A., and Shokat, K.M. (2007). Chemically targeting the PI3K family. *Biochemical Society transactions* 35, 245-249.
- Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., and Ghosh, S. (2013). Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38, 119-130.
- Koffron, A.J., Patterson, B.K., Yan, S., Kaufman, D.B., Fryer, J.P., Stuart, F.P., and Abecassis, M.I. (1997). Latent human cytomegalovirus: a functional study. *Transplantation proceedings* 29, 793-795.
- Kohler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D., and Roos, D.S. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 275, 1485-1489.
- Kong, D., and Yamori, T. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer science* 99, 1734-1740.
- Kontny, E., Kurowska, M., Szczepanska, K., and Maslinski, W. (2000). Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes. *Journal of leukocyte biology* 67, 249-258.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R.P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology* 4, 69-77.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Muthukumar, G., Cook, J.R., Garotta, G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., *et al.* (1995). Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *The Journal of biological chemistry* 270, 20915-20921.
- Krause, C.D., Mei, E., Xie, J., Jia, Y., Bopp, M.A., Hochstrasser, R.M., and Pestka, S. (2002). Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1, 805-815.
- Kravets, E., Degrandi, D., Weidtkamp-Peters, S., Ries, B., Konermann, C., Felekyan, S., Dargazanli, J.M., Praefcke, G.J., Seidel, C.A., Schmitt, L., *et al.* (2012). The GTPase activity of murine guanylate-binding protein 2 (mGBP2) controls the intracellular localization and recruitment to the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of biological chemistry* 287, 27452-27466.
- Krebs, D.L., and Hilton, D.J. (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378-387.
- Krendel, M., Zenke, F.T., and Bokoch, G.M. (2002). Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nature cell biology* 4, 294-301.
- Krmpotic, A., Bubic, I., Polic, B., Lucin, P., and Jonjic, S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 1263-1277.
- Krmpotic, A., Busch, D.H., Bubic, I., Gebhardt, F., Hengel, H., Hasan, M., Scalzo, A.A., Koszinowski, U.H., and Jonjic, S. (2002). MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nature immunology* 3, 529-535.
- Krmpotic, A., Hasan, M., Loewendorf, A., Saulig, T., Halenius, A., Lenac, T., Polic, B., Bubic, I., Kriegeskorte, A., Pernjak-Pugel, E., *et al.* (2005). NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *The Journal of experimental medicine* 201, 211-220.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* 388, 621-625.

- Labesse, G., Gelin, M., Bessin, Y., Lebrun, M., Papoin, J., Cerdan, R., Arold, S.T., and Dubremetz, J.F. (2009). ROP2 from *Toxoplasma gondii*: a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity. *Structure* *17*, 139-146.
- Lafuse, W.P., Brown, D., Castle, L., and Zwilling, B.S. (1995). Cloning and characterization of a novel cDNA that is IFN-gamma-induced in mouse peritoneal macrophages and encodes a putative GTP-binding protein. *Journal of leukocyte biology* *57*, 477-483.
- Lang, C., Gross, U., and Luder, C.G. (2007). Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology research* *100*, 191-203.
- LaRosa, D.F., Stumhofer, J.S., Gelman, A.E., Rahman, A.H., Taylor, D.K., Hunter, C.A., and Turka, L.A. (2008). T cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 3855-3860.
- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P.J., Vial, H., and Dubremetz, J.F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cellular microbiology* *7*, 1823-1833.
- Lee, H.M., Shin, D.M., Yuk, J.M., Shi, G., Choi, D.K., Lee, S.H., Huang, S.M., Kim, J.M., Kim, C.D., Lee, J.H., *et al.* (2011). Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1. *J Immunol* *186*, 1248-1258.
- Lee, J.C., Field, D.J., and Lee, L.L. (1980). Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry* *19*, 6209-6215.
- Lee, S.H., Girard, S., Macina, D., Busa, M., Zafer, A., Belouchi, A., Gros, P., and Vidal, S.M. (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nature genetics* *28*, 42-45.
- Leriche, M.A., and Dubremetz, J.F. (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitology research* *76*, 559-562.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* *120*, 159-162.
- 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. *Molecular and cellular biology* *11*, 182-191.
- Li, G., Zhang, J., Sun, Y., Wang, H., and Wang, Y. (2009). The evolutionarily dynamic IFN-inducible GTPase proteins play conserved immune functions in vertebrates and cephalochordates. *Molecular biology and evolution* *26*, 1619-1630.
- Li, J.S., Han, Q., Fang, J., Rizzi, M., James, A.A., and Li, J. (2007). Biochemical mechanisms leading to tryptophan 2,3-dioxygenase activation. *Archives of insect biochemistry and physiology* *64*, 74-87.
- Li, L., Chen, Y., and Gibson, S.B. (2013). Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cellular signalling* *25*, 50-65.
- 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. *The Journal of experimental medicine* *203*, 2063-2071.
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J.G., Schweizer, A., Berger, E.G., Hauri, H.P., Yuan, L.C., and Klausner, R.D. (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* *60*, 821-836.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today* *11*, 237-244.
- Lodoen, M.B., Abenes, G., Umamoto, S., Houchins, J.P., Liu, F., and Lanier, L.L. (2004). The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. *The Journal of experimental medicine* *200*, 1075-1081.

- Lorenz, H., Hailey, D.W., and Lippincott-Schwartz, J. (2006). Fluorescence protease protection of GFP chimeras to reveal protein topology and subcellular localization. *Nature methods* 3, 205-210.
- Lovett, J.L., Marchesini, N., Moreno, S.N., and Sibley, L.D. (2002). *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca<sup>2+</sup> release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>)/ryanodine-sensitive stores. *The Journal of biological chemistry* 277, 25870-25876.
- 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. *European journal of immunology* 31, 1475-1484.
- Luft, B.J., and Remington, J.S. (1992). *Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 15, 211-222.
- MacMicking, J.D. (2004). IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends in immunology* 25, 601-609.
- 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.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 741-752.
- Malu, S., Srinivasan, S., Kumar Maiti, P., Rajagopal, D., John, B., and Nandi, D. (2003). IFN-gamma bioassay: development of a sensitive method by measuring nitric oxide production by peritoneal exudate cells from C57BL/6 mice. *Journal of immunological methods* 272, 55-65.
- Martens, S., and Howard, J. (2006). The interferon-inducible GTPases. *Annual review of cell and developmental biology* 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 pathogens* 1, e24.
- Martens, S., Sabel, K., Lange, R., Uthai, 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.
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., and Schachtele, C. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *The Journal of biological chemistry* 268, 9194-9197.
- Masek, K.S., Fiore, J., Leitges, M., Yan, S.F., Freedman, B.D., and Hunter, C.A. (2006). Host cell Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C regulate innate recognition of *Toxoplasma gondii*. *Journal of cell science* 119, 4565-4573.
- Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., *et al.* (2011). CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* 35, 249-259.
- Mason, N.J., Fiore, J., Kobayashi, T., Masek, K.S., Choi, Y., and Hunter, C.A. (2004). TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity* 72, 5662-5667.
- Matsumoto, M., Tanaka, N., Harada, H., Kimura, T., Yokochi, T., Kitagawa, M., Schindler, C., and Taniguchi, T. (1999). Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biological chemistry* 380, 699-703.
- McCarthy, D.A. (2007). *Flow Cytometry: Principles and Applications* (Totowa NJ: Humana Press).
- Melo, M.B., Kasperkovitz, P., Cerny, A., Konen-Waisman, S., Kurt-Jones, E.A., Lien, E., Beutler, B., Howard, J.C., Golenbock, D.T., and Gazzinelli, R.T. (2010). UNC93B1 mediates host resistance to infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 6, e1001071.

- Melzer, T., Duffy, A., Weiss, L.M., and Halonen, S.K. (2008). The gamma interferon (IFN-gamma)-inducible GTP-binding protein IGTP is necessary for toxoplasma vacuolar disruption and induces parasite egression in IFN-gamma-stimulated astrocytes. *Infection and immunity* 76, 4883-4894.
- Mendoza, M., Hyman, A.A., and Glotzer, M. (2002). GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Current biology* : CB 12, 1858-1863.
- Mercier, C., Dubremetz, J.F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L.D., and Cesbron-Delauw, M.F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma parasitophorous* vacuole induced by parasite proteins. *Molecular biology of the cell* 13, 2397-2409.
- 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. *Molecular biology of the cell* 21, 2514-2528.
- Michel, R., Schupp, K., Raether, W., and Bierther, F.W. (1980). Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. *International journal for parasitology* 10, 309-313.
- Mineo, J.R., McLeod, R., Mack, D., Smith, J., Khan, I.A., Ely, K.H., and Kasper, L.H. (1993). Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol* 150, 3951-3964.
- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542-545.
- Mocarski, E. (1996). Cytomegalovirus and their Replication. In *Virology*, D.M.K. B.N. Fields, P.M. Howley, ed. (Philadelphphia: Lippincott-Raven Publisher), pp. pp. 2447-2492.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8680-8685.
- 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 IkkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *Journal of cell science* 116, 4359-4371.
- Montoya, J.G., and Remington, J.S. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 47, 554-566.
- Mordstein, M., Kochs, G., Dumoutier, L., Renaud, J.C., Paludan, S.R., Klucher, K., and Staeheli, P. (2008). Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS pathogens* 4, e1000151.
- Mordue, D.G., Hakansson, S., Niesman, I., and Sibley, L.D. (1999). *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental parasitology* 92, 87-99.
- 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.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7, 145-173.
- Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M.A., Tham, T.N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C., *et al.* (2010). Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell host & microbe* 8, 433-444.
- Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 183-194.
- Mostowy, S., Nam Tham, T., Danckaert, A., Guadagnini, S., Boisson-Dupuis, S., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2009). Septins regulate bacterial entry into host cells. *PLoS one* 4, e4196.

- Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M.A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., and Cossart, P. (2011). p62 and NDP52 proteins target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways. *The Journal of biological chemistry* 286, 26987-26995.
- Mowen, K., and David, M. (2000). Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1. *Molecular and cellular biology* 20, 7273-7281.
- Mueller, A., and Strange, P.G. (2004). The chemokine receptor, CCR5. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 35-38.
- 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. *Infection and immunity* 73, 4634-4642.
- Munafò, D.B., and Colombo, M.I. (2001). A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *Journal of cell science* 114, 3619-3629.
- Naschberger, E., Croner, R.S., Merkel, S., Dimmler, A., Tripal, P., Amann, K.U., Kremmer, E., Brueckl, W.M., Papadopoulos, T., Hohenadl, C., *et al.* (2008). Angiostatic immune reaction in colorectal carcinoma: Impact on survival and perspectives for antiangiogenic therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer* 123, 2120-2129.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine* 158, 670-689.
- Nelson, C. (2001). *Lehninger Biochemie*, Vol 4. Auflage (Springer-Lehrbuch Berlin).
- 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*. *Infection and immunity* 76, 828-844.
- 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. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 22, 899-909.
- Nogales, E. (1999). A structural view of microtubule dynamics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 56, 133-142.
- Ortega-Barria, E., and Boothroyd, J.C. (1999). A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *The Journal of biological chemistry* 274, 1267-1276.
- Ossorio, P.N., Schwartzman, J.D., and Boothroyd, J.C. (1992). A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Molecular and biochemical parasitology* 50, 1-15.
- Otani, T., Nakamura, S., Toki, M., Motoda, R., Kurimoto, M., and Orita, K. (1999). Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. *Cellular immunology* 198, 111-119.
- Paludan, S.R. (1998). Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scandinavian journal of immunology* 48, 459-468.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* 282, 24131-24145.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 283, 32143-32151.
- Parker, P.J., and Murray-Rust, J. (2004). PKC at a glance. *Journal of cell science* 117, 131-132.
- Parton, R.G., Joggerst, B., and Simons, K. (1994). Regulated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology* 127, 1199-1215.

- Pathak, R., and Dermardirossian, C. (2013). GEF-H1: Orchestrating the interplay between cytoskeleton and vesicle trafficking. *Small GTPases* 4.
- 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. *Journal of virology* 64, 3370-3375.
- Pellet, P.R. (2006). *The Herpesviridae: An introduction*.
- Pestka, S. (2007). The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *The Journal of biological chemistry* 282, 20047-20051.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 992-998.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45.
- Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 908-912.
- Pinon, J.M., Dumon, H., Chemla, C., Franck, J., Petersen, E., Lebech, M., Zufferey, J., Bessieres, M.H., Marty, P., Holliman, R., *et al.* (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. *Journal of clinical microbiology* 39, 2267-2271.
- Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. (2008). *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell host & microbe* 3, 77-87.
- Ploegh, H.L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* 280, 248-253.
- Plummer, G. (1967). Cytomegaloviruses. *Modern trends in medical virology* 1, 182-206.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Pomeroy, C., DeLong, D., Clabots, C., Riciputi, P., and Filice, G.A. (1998). Role of interferon-gamma in murine cytomegalovirus infection. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 132, 124-133.
- Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M.M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W.F., Dodge, J., Grindey, G., *et al.* (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer research* 54, 2419-2423.
- Praefcke, G.J., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 133-147.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2000). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* 403, 567-571.
- Prasanna, S.J., Saha, B., and Nandi, D. (2007). Involvement of oxidative and nitrosative stress in modulation of gene expression and functional responses by IFN $\gamma$ . *International immunology* 19, 867-879.
- Ravindran, S., Lodoen, M.B., Verhelst, S.H., Bogyo, M., and Boothroyd, J.C. (2009). 4-Bromophenacyl bromide specifically inhibits rhoptry secretion during *Toxoplasma* invasion. *PloS one* 4, e8143.
- Reddehase, M.J., Balthesen, M., Rapp, M., Jonjic, S., Pavic, I., and Koszinowski, U.H. (1994). The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *The Journal of experimental medicine* 179, 185-193.

- Reddehase, M.J., Jonjic, S., Weiland, F., Mutter, W., and Koszinowski, U.H. (1988). Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *Journal of virology* *62*, 1061-1065.
- Reddehase, M.J., Weiland, F., Munch, K., Jonjic, S., Luske, A., and Koszinowski, U.H. (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *Journal of virology* *55*, 264-273.
- Reese, M.L., and Boothroyd, J.C. (2009). A helical membrane-binding domain targets the Toxoplasma ROP2 family to the parasitophorous vacuole. *Traffic* *10*, 1458-1470.
- Reese, M.L., and Boothroyd, J.C. (2011). A conserved non-canonical motif in the pseudoactive site of the ROP5 pseudokinase domain mediates its effect on Toxoplasma virulence. *The Journal of biological chemistry* *286*, 29366-29375.
- Reid, A.J., Vermont, S.J., Cotton, J.A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G.A., Konen-Waisman, S., Latham, S.M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M.A., *et al.* (2012). Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS pathogens* *8*, e1002567.
- Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes. *Annual review of immunology* *10*, 97-121.
- Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Pazmany, L., and Strominger, J.L. (1997). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* *386*, 514-517.
- Robben, J.H., Pollak, Y.W., Kirpensteijn, J., Boroffka, S.A., van den Ingh, T.S., Teske, E., and Voorhout, G. (2005). Comparison of ultrasonography, computed tomography, and single-photon emission computed tomography for the detection and localization of canine insulinoma. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* *19*, 15-22.
- Roberts, F., Roberts, C.W., Johnson, J.J., Kyle, D.E., Krell, T., Coggins, J.R., Coombs, G.H., Milhous, W.K., Tzipori, S., Ferguson, D.J., *et al.* (1998). Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* *393*, 801-805.
- Robertsen, B., Zou, J., Secombes, C., and Leong, J.A. (2006). Molecular and expression analysis of an interferon-gamma-inducible guanylate-binding protein from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and comparative immunology* *30*, 1023-1033.
- Roizman, B. (1982). The Herpesviruses. In *Herpesviruses*, B. Roizman, ed. (New York and London: Plenum Press), pp. 1-23.
- Roizman, B. (1996). The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 11307-11312.
- Roizman, B., and Baines, J. (1991). The diversity and unity of Herpesviridae. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* *14*, 63-79.
- Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews Molecular cell biology* *6*, 167-180.
- Sad, S., and Mosmann, T.R. (1995). Interleukin (IL) 4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8+ TC1 cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *The Journal of experimental medicine* *182*, 1505-1515.
- Sadler, A.J., and Williams, B.R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews Immunology* *8*, 559-568.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., and Boothroyd, J.C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in parasitology* *21*, 476-481.

- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Collier, 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.
- Saffer, L.D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J.F., and Schwartzman, J.D. (1992). Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *The Journal of protozoology* *39*, 526-530.
- Saraste, J., and Svensson, K. (1991). Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *Journal of cell science* *100 ( Pt 3)*, 415-430.
- Scalzo, A.A. (2002). Successful control of viruses by NK cells--a balance of opposing forces? *Trends in microbiology* *10*, 470-474.
- 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., Grunwald, 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*. *The Journal of experimental medicine* *185*, 1261-1273.
- Schiff, P.B., and Horwitz, S.B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *77*, 1561-1565.
- Schneider, A.G., Abi Abdallah, D.S., Butcher, B.A., and Denkers, E.Y. (2013). *Toxoplasma gondii* triggers phosphorylation and nuclear translocation of dendritic cell STAT1 while simultaneously blocking IFN-gamma-induced STAT1 transcriptional activity. *PLoS one* *8*, e60215.
- Schnorr, J.J., Schneider-Schaulies, S., Simon-Jodicke, A., Pavlovic, J., Horisberger, M.A., and ter Meulen, V. (1993). MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *Journal of virology* *67*, 4760-4768.
- Schreiber, R.D., and Farrar, M.A. (1993). The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterologia Japonica* *28 Suppl 4*, 88-94; discussion 95-86.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* *75*, 163-189.
- Schroder, K., Sweet, M.J., and Hume, D.A. (2006). Signal integration between IFN-gamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* *211*, 511-524.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* *140*, 821-832.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J., and Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 509-513.
- Schwemmler, M., Kaspers, B., Irion, A., Staeheli, P., and Schultz, U. (1996). Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines. *The Journal of biological chemistry* *271*, 10304-10308.
- Seglen, P.O., and Gordon, P.B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *79*, 1889-1892.
- Selgrade, M.K., and Osborn, J.E. (1974). Role of macrophages in resistance to murine cytomegalovirus. *Infection and immunity* *10*, 1383-1390.

- Selleck, E.M., Fentress, S.J., Beatty, W.L., Degrandi, D., Pfeffer, K., Virgin, H.W.t., Macmicking, J.D., and Sibley, L.D. (2013). Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 9, e1003320.
- Shapira, S., Speirs, K., Gerstein, A., Caamano, J., and Hunter, C.A. (2002). Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of infectious diseases* 185 Suppl 1, S66-72.
- Sheetz, M.P., Sable, J.E., and Dobereiner, H.G. (2006). Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 35, 417-434.
- 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* 336, 481-485.
- Sher, A., Denkers, E.Y., and Gazzinelli, R.T. (1995). Induction and regulation of host cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii*. *Ciba Foundation symposium* 195, 95-104; discussion 104-109.
- Shigeoka, A.A., Holscher, T.D., King, A.J., Hall, F.W., Kiosses, W.B., Tobias, P.S., Mackman, N., and McKay, D.B. (2007). TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 178, 6252-6258.
- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., and Nathan, C. (1999). Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10, 29-38.
- Shinji, H., Akagawa, K.S., and Yoshida, T. (1994). LPS induces selective translocation of protein kinase C-beta in LPS-responsive mouse macrophages, but not in LPS-nonresponsive mouse macrophages. *J Immunol* 153, 5760-5771.
- Shotland, Y., Kramer, H., and Groisman, E.A. (2003). The *Salmonella* SpiC protein targets the mammalian Hook3 protein function to alter cellular trafficking. *Molecular microbiology* 49, 1565-1576.
- Shtrichman, R., and Samuel, C.E. (2001). The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Current opinion in microbiology* 4, 251-259.
- Sibley, L.D. (2003). *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 4, 581-586.
- Sibley, L.D., and Andrews, N.W. (2000). Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic* 1, 100-106.
- Sibley, L.D., Hakansson, S., and Carruthers, V.B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Current biology* : CB 8, R12-14.
- Sibley, L.D., and Howe, D.K. (1996). Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Current topics in microbiology and immunology* 219, 3-15.
- Sibley, L.D., Niesman, I.R., Asai, T., and Takeuchi, T. (1994). *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Experimental parasitology* 79, 301-311.
- Sibley, L.D., Qiu, W., Fentress, S., Taylor, S.J., Khan, A., and Hui, R. (2009). Forward genetics in *Toxoplasma gondii* reveals a family of rhoptyr kinases that mediates pathogenesis. *Eukaryotic cell* 8, 1085-1093.
- Sibley, L.D., Weidner, E., and Krahenbuhl, J.L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315, 416-419.
- Sinai, A.P., and Joiner, K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of cell biology* 154, 95-108.

- 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. *Journal of cell science* 110 (Pt 17), 2117-2128.
- 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.
- Skaletskaya, A., Bartle, L.M., Chittenden, T., McCormick, A.L., Mocarski, E.S., and Goldmacher, V.S. (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7829-7834.
- Smith, J.E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology* 25, 1301-1309.
- Smith, R.D., and Wehner, R.W. (1980). Acute cytomegalovirus glomerulonephritis: an experimental model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 43, 278-286.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W., and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *The Journal of cell biology* 136, 1007-1021.
- Song, D.H., and Lee, J.O. (2012). Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunological reviews* 250, 216-229.
- 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. *Journal of leukocyte biology* 58, 477-484.
- Spekker, K., Leineweber, M., Degrandi, D., Ince, V., Brunder, S., Schmidt, S.K., Stuhlsatz, S., Howard, J.C., Schares, G., Degistirici, O., *et al.* (2013). Antimicrobial effects of murine mesenchymal stromal cells directed against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: role of immunity-related GTPases (IRGs) and guanylate-binding proteins (GBPs). *Medical microbiology and immunology* 202, 197-206.
- Staeheli, P., Danielson, P., Haller, O., and Sutcliffe, J.G. (1986). Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Molecular and cellular biology* 6, 4770-4774.
- Stark, J.J., Dillman, R.O., Schulof, R., Wiemann, M.C., Barth, N.M., Honeycutt, P.J., and Soori, G. (1998). Interferon-alpha and chemohormonal therapy for patients with advanced melanoma: final results of a phase I-II study of the Cancer Biotherapy Research Group and the Mid-Atlantic Oncology Program. *Cancer* 82, 1677-1681.
- 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 biology* 8, e1000576.
- Stvrtinova, V. (1995). [Vasculitides of the coronary arteries]. *Bratislavske lekarske listy* 96, 544-551.
- Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., and Sibley, L.D. (2003). Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299, 414-416.
- Sugamura, K., Ishii, N., and Weinberg, A.D. (2004). Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature reviews Immunology* 4, 420-431.
- Sukhumavasi, W., Egan, C.E., Warren, A.L., Taylor, G.A., Fox, B.A., Bzik, D.J., and Denkers, E.Y. (2008). TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. *J Immunol* 181, 3464-3473.
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., and Ward, G.E. (1996). *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8413-8418.
- Suzuki, Y., and Joh, K. (1994). Effect of the strain of *Toxoplasma gondii* on the development of toxoplasmic encephalitis in mice treated with antibody to interferon-gamma. *Parasitology research* 80, 125-130.

- Sweeney, K.R., Morrissette, N.S., LaChapelle, S., and Blader, I.J. (2010). Host cell invasion by *Toxoplasma gondii* is temporally regulated by the host microtubule cytoskeleton. *Eukaryotic cell* 9, 1680-1689.
- Syguda, A., Bauer, M., Benschaid, U., Ostler, N., Naschberger, E., Ince, S., Sturzl, M., and Herrmann, C. (2012). Tetramerization of human guanylate-binding protein 1 is mediated by coiled-coil formation of the C-terminal alpha-helices. *The FEBS journal* 279, 2544-2554.
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E.M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., *et al.* (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature immunology* 7, 156-164.
- Taylor, G.A., Jeffers, M., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Vande Woude, G.F. (1996). Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. *The Journal of biological chemistry* 271, 20399-20405.
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., *et al.* (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314, 1776-1780.
- Thimme, R., Frese, M., Kochs, G., and Haller, O. (1995). Mx1 but not MxA confers resistance against tick-borne Dhori virus in mice. *Virology* 211, 296-301.
- 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. *Nature immunology* 10, 907-917.
- Tomura, M., Maruo, S., Mu, J., Zhou, X.Y., Ahn, H.J., Hamaoka, T., Okamura, H., Nakanishi, K., Clark, S., Kurimoto, M., *et al.* (1998). Differential capacities of CD4+, CD8+, and CD4-CD8- T cell subsets to express IL-18 receptor and produce IFN-gamma in response to IL-18. *J Immunol* 160, 3759-3765.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 286, 30471-30480.
- Trilling, M., Le, V.T., Fiedler, M., Zimmermann, A., Bleifuss, E., and Hengel, H. (2011). Identification of DNA-damage DNA-binding protein 1 as a conditional essential factor for cytomegalovirus replication in interferon-gamma-stimulated cells. *PLoS pathogens* 7, e1002069.
- Tripal, P., Bauer, M., Naschberger, E., Mortinger, T., Hohenadl, C., Cornali, E., Thureau, M., and Sturzl, M. (2007). Unique features of different members of the human guanylate-binding protein family. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 27, 44-52.
- Valere, A., Garnotel, R., Villena, I., Guenounou, M., Pinon, J.M., and Aubert, D. (2003). Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion. *Parasite* 10, 59-64.
- Van Hoeven, N., Belser, J.A., Szretter, K.J., Zeng, H., Staeheli, P., Swayne, D.E., Katz, J.M., and Tumpey, T.M. (2009). Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *Journal of virology* 83, 2851-2861.
- Vega, I.E., and Hsu, S.C. (2003). The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *Neuroreport* 14, 31-37.
- Vermeire, K., Heremans, H., Vandeputte, M., Huang, S., Billiau, A., and Matthys, P. (1997). Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 158, 5507-5513.
- 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? *Journal of*

interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 20, 991-1000.

Virreira Winter, S., Niedelman, W., Jensen, K.D., Rosowski, E.E., Julien, L., Spooner, E., Caradonna, K., Burleigh, B.A., Saeij, J.P., Ploegh, H.L., *et al.* (2011). Determinants of GBP recruitment to *Toxoplasma gondii* vacuoles and the parasitic factors that control it. *PloS one* 6, e24434.

Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., and Brown, R.F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry* 269, 5241-5248.

Wang, N., and Stamenovic, D. (2002). Mechanics of vimentin intermediate filaments. *Journal of muscle research and cell motility* 23, 535-540.

Weiss, L.M., and Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 5, D391-405.

Weller, T.H., Hanshaw, J.B., and Scott, D.E. (1960). Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12, 130-132.

Welsh, R.M., Biron, C.A., Bukowski, J.F., McIntyre, K.W., and Yang, H. (1984). Role of natural killer cells in virus infections of mice. *Survey and synthesis of pathology research* 3, 409-431.

Welsh, R.M., Brubaker, J.O., Vargas-Cortes, M., and O'Donnell, C.L. (1991). Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *The Journal of experimental medicine* 173, 1053-1063.

Welsh, R.M., O'Donnell, C.L., and Shultz, L.D. (1994). Antiviral activity of NK 1.1+ natural killer cells in C57BL/6 scid mice infected with murine cytomegalovirus. *Natural immunity* 13, 239-245.

Williams, B.R., and Haque, S.J. (1997). Interacting pathways of interferon signaling. *Seminars in oncology* 24, S9-70-S79-77.

Williams, M.E., Chang, T.L., Burke, S.K., Lichtman, A.H., and Abbas, A.K. (1991). Activation of functionally distinct subsets of CD4+ T lymphocytes. *Research in immunology* 142, 23-28.

Wolf, A., Cowen, D., and Paige, B. (1939). Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. *Science* 89, 226-227.

Yadav, M., Roach, S.K., and Schorey, J.S. (2004). Increased mitogen-activated protein kinase activity and TNF-alpha production associated with *Mycobacterium smegmatis*- but not *Mycobacterium avium*-infected macrophages requires prolonged stimulation of the calmodulin/calmodulin kinase and cyclic AMP/protein kinase A pathways. *J Immunol* 172, 5588-5597.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function* 23, 33-42.

Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., *et al.* (2012). A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 37, 302-313.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., *et al.* (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., *et al.* (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-329.

Yang, C., and Kazanietz, M.G. (2003). Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends in pharmacological sciences* 24, 602-608.

- Yap, G.S., Ling, Y., and Zhao, Y. (2007). Autophagic elimination of intracellular parasites: convergent induction by IFN-gamma and CD40 ligation? *Autophagy* 3, 163-165.
- 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., *et al.* (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.
- Yoshida, S., and Sasakawa, C. (2003). Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion. *Trends in microbiology* 11, 139-143.
- 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. *Molecular and cellular biology* 19, 2416-2424.
- Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 9-14.
- Yu, T., Xiao, Y., Bai, Y., Ru, Q., Luo, G., Dierich, M.P., and Chen, Y. (2000). Human interferon-beta inhibits binding of HIV-1 gp41 to lymphocyte and monocyte cells and binds the potential receptor protein P50 for HIV-1 gp41. *Immunology letters* 73, 19-22.
- Zhang, J.G., Farley, A., Nicholson, S.E., Willson, T.A., Zugaro, L.M., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., *et al.* (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2071-2076.
- Zhao, Y.O., Khaminets, A., Hunn, J.P., and Howard, J.C. (2009). Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN-gamma-inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS pathogens* 5, e1000288.
- Zhao, Z., Fux, B., Goodwin, M., Dunay, I.R., Strong, D., Miller, B.C., Cadwell, K., Delgado, M.A., Ponpuak, M., Green, K.G., *et al.* (2008). Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell host & microbe* 4, 458-469.
- Zhu, H., Shen, Y., and Shenk, T. (1995). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *Journal of virology* 69, 7960-7970.
- Zhu, Z., Wei, J., Shi, Z., Yang, Y., Shao, D., Li, B., Wang, X., and Ma, Z. (2013). Identification of human guanylate-binding protein 1 gene (hGBP1) as a direct transcriptional target gene of p53. *Biochemical and biophysical research communications* 436, 204-211.
- 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.



## Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Bereitstellung des interessanten Themas, die konstante Unterstützung während der letzten Jahre und besonders für die große Hilfe in den letzten Wochen.

Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst danke ich für die freundliche Betreuung im Rahmen der MOI Graduiertenschule und die Übernahme des Gutachtens seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Daniel Degrandi. Danke für die Unterstützung und die Motivation in den letzten Jahren und besonders in den letzten Wochen, egal ob im Labor oder im LJ.

Bei der Jürgen Manchot-Stiftung möchte ich mich für die Finanzierung im Rahmen der MOI-Graduiertenschule bedanken und besonders Frau Dr. Inge Krümpelbeck für ihre Hilfe in sämtlichen „Doktoranden-belangen“.

Vielen Dank an Dr. Albert Zimmermann und Katrin Ehrhardt für die Bereitstellung des Virus und für die experimentelle Hilfe während der Infektions-Versuchen.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und der Virologie für die gute Atmosphäre, egal ob während des Lunch-Seminars, Sommerfest oder Weihnachtsfeier – danke für die freundliche Aufnahme und stetige Hilfsbereitschaft in diesem Institut.

Ein besonderes Dankeschön geht an die Mädels aus dem Schreibraum 14, Julia, Nicole, Pia und Sarah – egal ob im Labor, Büro, beim Mittagessen, in der Skihalle oder im Kletterwald – es hat viel Spaß mit euch gemacht und die Zusammenarbeit mit euch hat die Zeit in Düsseldorf um ein Vielfaches verschönert!!

Vielen Dank an Margret für ihre Back-künste und Hilfsbereitschaft in Toxo-Angelegenheiten; Julia, Sabine und Silke für schöne Stunden im und außerhalb des Labors. Ich werde euch alle vermissen!

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Brüdern für die stetige Unterstützung und notwendigen Ablenkungen in sämtlichen Lebenslagen bedanken.

Abschließend möchte ich diese Arbeit dem Team Tiger e.V. widmen – Danke für die notwendige, elitäre Förderung und gelegentliche Ablenkung. Team Tiger für immer im Herzen!

