

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Untersuchung muriner Guanylat-bindender-Proteine bei Interferon- $\gamma$  induzierten  
antiparasitären und antiviralen Wirkmechanismen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eva Elise Wischmann

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Pfeffer

Koreferent: Univ.- Prof. Dr. Becker

## Publikationen

Teile der in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden wie folgt publiziert:

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.**

In Proc Natl Acad Sci U S A 110, 294-29

## Zusammenfassung

Murine Guanylat-bindende-Proteine (mGBPs) sind 65 kDa große GTPasen und gehören zur Dynamin-Superfamilie. Sie sind maßgeblich an der anti-bakteriellen und anti-parasitären Erregerabwehr in der Maus beteiligt. Durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Stimulation wird die Expression verschiedener Gene, unter anderem der mGBPs, reguliert.

Um den Wirkmechanismus der mGBPs in der Erregerabwehr zu untersuchen, wurden Kolokalisationsstudien in *T.gondii* infizierten GFP-mGBP2-, GFP-mGBP7- und GFP-mGBP9- exprimierenden 3T3-NIH-Zellen untersucht. Um die Wirkung von mGBP2 auf virale Infektionen zu analysieren, wurden mGBP2<sup>+/+</sup> murine embryonale Fibroblasten (MEFs) und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs mit MCMV infiziert.

In den Kolokalisationsstudien wurden die stabil transduzierten 3T3-NIH-GFP-mGBP-Zellen zunächst mit *T.gondii* infiziert und mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Anschließend wurden die jeweils unterschiedlichen GFP-mGBP-Fusionskonstrukte exprimierenden 3T3-NIH Zellen in Kombinationen mit mGBP1- und mGBP2-spezifischen-Antikörpern gefärbt und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

In den Kolokalisationsstudien ließ sich zeigen, dass mGBP1 und mGBP2 häufiger mit der Parasitophoren Vakuole (PV) eines intrazellulären *T.gondii* als mGBP7 und mGBP9 kolokalisieren. Dabei bleibt noch zu klären, ob die beobachteten Rekrutierungsunterschiede der mGBPs zur PV durch die Qualität der Antikörperfärbung beeinflusst werden.

Anschließend wurden die mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs mit IFN- $\gamma$  stimuliert und mit  $\Delta$ m157-MCMV:luciferase Virus infiziert. Über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen wurden die Zellen beobachtet und mithilfe von Luciferase-Assays und Western-Blotting wurde die Virusreplikation bestimmt.

Die Luciferase-Assays der mit MCMV infizierten Zellen zeigten, dass überraschenderweise in den mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs die MCMV Replikationsrate geringer als in den mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs war. Entgegen der ursprünglichen Arbeitshypothese konnte für mGBP2 in vitro kein antiviraler Effekt nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die mGBPs unterschiedlich stark an die PV von *T.gondii* rekrutiert werden und dass sich in MEFs kein zellautonomer antiviraler Effekt der mGBPs gegen MCMV nachweisen lässt.

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -	Anti-
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>AK</b>	Antikörper
<b>ALU</b>	Arbitrary Light Units
<b>APCs</b>	Professionelle Antigenpräsentierende Zellen
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>B-ME</b>	$\beta$ -Mercaptoethanol
<b>C°</b>	Celsius
<b>CCV</b>	Clathrin Coated Vesikel
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CMV</b>	Zytomegalievirus
<b>Cy 2/3</b>	Cyanine 2/3
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DC</b>	Dendritische Zelle
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>ECL</b>	Enhanced Chemoluminescence
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>et al.</b>	lat: und andere
<b>FKS</b>	Fötales Kälberserum
<b>GAF</b>	$\gamma$ Interferon Activation Factor
<b>GAS</b>	Gamma Activated Site
<b>GBP</b>	65 kDa Guanylat bindendes Protein
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GED</b>	GTPase –Effektor-Domäne
<b>GFP</b>	grün-fluoreszierendes Protein
<b>GMP</b>	Guanosinmonophosphat
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>H</b>	Stunde
<b>HCMV</b>	humanes Zytomegalievirus
<b>HCV</b>	Hepatitis C Virus
<b>HEPA</b>	High Efficiency Particulate Airfilter
<b>HFF</b>	humane Fibroblasten
<b>hGBP</b>	humanes Guanylat bindendes Protein
<b>HHV</b>	humanes Herpesvirus
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase
<b>HSV</b>	Herpes Simplex Virus
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFNAR Rezeptor</b>	IFN $\alpha$ -Rezeptor
<b>IFNGR Rezeptor</b>	IFN $\gamma$ -Rezeptor
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleukin 1 $\beta$
<b>IMDM</b>	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<b>IRF</b>	Interferon Regulatory Factor
<b>IRG</b>	Immunity-Related GTPase
<b>ISG</b>	IFN stimuliertes Gen
<b>ISGF3</b>	IFN stimulierter G-factor 3
<b>ISRE</b>	IFN stimuliertes Response Element
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide

<b>µl</b>	Microliter
<b>mA</b>	Milliamper
<b>MCMV</b>	murines Zytomegalievirus
<b>MEFs</b>	murine embryonale Fibroblasten
<b>mGBP</b>	murines Guanylät bindendes Protein
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility complex)
<b>min</b>	Minuten
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>MOI</b>	Multiplicity of infection
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>Mx</b>	Myxovirusresistenz
<b>NIH 3T3</b>	3-day transfer, inoculum $3 \times 10^5$ cells
<b>NK</b>	Natürliche Killerzellen
<b>OAS1</b>	2'-5'-oligoadenylate Synthetase 1
<b>OPA1</b>	Optic Atrophy 1
<b>p.i.</b>	post infectionem
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PKR</b>	Proteinkinase R
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PV</b>	Parasitophore Vakuole
<b>Ras</b>	Rat sarcoma
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>Sag1</b>	Surface Antigen 1
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>SDS-Page</b>	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SOCS-1</b>	Suppressor of Cytokine Signaling 1
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b><i>T.gondii</i></b>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<b>TBS-T</b>	mixture of Tris-Buffered Saline and Tween 20
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>U/ml</b>	Units/Milliliter
<b>Ü/N</b>	über Nacht
<b>UpM</b>	Umdrehung pro Minute
<b>VSV</b>	Vesicular stomatitis Virus
<b>w/o</b>	Without
<b>WB</b>	Westernblot
<b>-/-</b>	Knockout
<b>+/+</b>	Wildtyp

<b>Publikationen</b> .....	
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das Immunsystem.....	1
1.2. Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ).....	2
1.3. Die Dynamin Superfamilie .....	5
1.4. Die murinen Guanylat-bindenden-Proteine (mGBPs) .....	6
1.4.1. Struktur und Aufbau der mGBPs .....	6
1.4.2. mGBP2 <sup>-/-</sup> Zellen.....	8
1.5. Toxoplasmose.....	8
1.6. Zytomegalie.....	11
1.6.1. Humaner und Muriner Stamm .....	11
1.6.2. MCMV Luciferase-Stamm .....	13
1.7. Zielsetzung.....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1. Materialien.....	15
2.1.1. Chemikalien .....	15
2.1.2. Antikörper.....	17
2.1.3. Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	17
2.1.4. Geräte .....	18
2.1.5. Stammlösungen und Puffer .....	19
2.1.6. Medien für die Zellkultur .....	21
2.1.7. Toxoplasmen- und Virenstämme.....	22
2.1.8. Zelllinien.....	22
2.1.9. Kits und Verbrauchsmaterial .....	22
2.1.10. Computerprogramme.....	23
2.2. Methoden .....	24
2.2.1. Allgemeine Zellkultur .....	24
2.2.2. Kultivierung von Zelllinien.....	24
2.2.3. Bestimmung der Zellzahl.....	24
2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	24
2.2.5. Stimulation von Zellen .....	25
2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung .....	25
2.2.7. Kultivierung von <i>T. gondii</i> .....	25
2.2.8. In vitro Infektion mit <i>T.gondii</i> .....	26
2.2.9. In-vitro Infektion mit MCMV .....	26
2.2.10. Luciferase-Assay .....	26

2.2.11. Western Blot.....	27
2.2.12. Anti- $\beta$ -Aktin Lade-Kontrolle.....	28
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1. Kolokalisationsstudien von murinen Guanylat- bindenden-Proteinen.....	29
3.2. Untersuchung der antiviralen Funktion von mGBP2 .....	35
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>42</b>
4.1. Interaktion verschiedener mGBPs in der parasitären Abwehr: Lokalisation der mGBPs in Bezug auf die intrazelluläre Lage von <i>T. gondii</i> .....	42
4.2. Auswirkung von mGBP2 auf eine virale Infektion am Beispiel der Zytomegalie-Infektion .....	44
4.3. Ausblick.....	48
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>49</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>54</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>.....</b>
<b>9. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>.....</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Seit Beginn der Evolution entwickelt sich das Immunsystem der Wirbeltiere stetig weiter. Es hilft dem Körper, sich vor Krankheitserregern aus der Umwelt zu schützen. Diese Krankheitserreger können Bakterien, Parasiten, Pilze oder Viren sein. Auch wird dem Immunsystem eine Wirkung gegen Tumoren zugeschrieben (Lee et al., 2013).

Das Immunsystem kann in zwei verschiedene Systeme unterteilt werden: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Bei einer Infektion wirkt zuerst das angeborene Immunsystem mit einer Immunantwort auf die Erregerinvasion. Diese ist unspezifisch, da die Rezeptoren, welche die Immunantwort induzieren, angeboren sind und auf konservierte Pathogenmoleküle reagieren. Erst nach einer gewissen Zeit setzt die erworbene Immunabwehr ein. Sie setzt spezifische zelluläre Rezeptoren ein und bildet Antikörper (AK) sowie spezifische T-Zellen aus, welche die Erreger zielgenau erkennen und abtöten können (Murphy, 2009).

Das angeborene Immunsystem besteht aus zellulären Komponenten, wie zum Beispiel den Makrophagen, den Granulozyten und den Natürlichen Killerzellen (NK). Eine weitere Komponente des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem.

Diese Strukturen kooperieren, sodass bereits kurz nach der Infektion der Organismus eine Reaktion in Gang setzt. Dabei werden unter Anderem verschiedene Botenstoffe ausgeschüttet, wie zum Beispiel Zytokine und Chemokine, welche diverse antimikrobielle Mechanismen in den Zielzellen induzieren und Immunzellen an den Ort der Infektion rekrutieren (Murphy, 2009). Außerdem sorgt das Komplementsystem, ein System welches aus verschiedenen Proteinen besteht, die proteolytisch abgebaut werden, für die Eliminierung der Pathogene (Hof, 2009).

Das erworbene Immunsystem ist essentiell für die Anpassungsfähigkeit des Organismus gegenüber neuen Pathogenen. Die Zellen des erworbenen Immunsystems sind in der Lage spezifische Antigenstrukturen zu erkennen und speziell dagegen gerichtete Antikörper herzustellen (Hof, 2009). Neben den antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie zum Beispiel den dendritischen Zellen (DCs), spielen hier die Lymphozyten eine große Rolle. Die T-Lymphozyten erkennen über CD-Oberflächenmoleküle und den Major-Histocompatibility-Komplex (MHC-Komplex) verschiedene pathogene Proteinstrukturen. B-Lymphozyten können im aktivierten

Zustand spezifische Antikörper bilden, die gegen die, von den vorherigen Komponenten des Immunsystems erkannten, Krankheitserreger wirken (Hof, 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die angeborene und die adaptive Immunabwehr kooperativ wirken. Ziel ist es, den Organismus kurz- und langfristig vor Infektionen zu schützen.

## **1.2. Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )**

Interferone wurden ursprünglich entdeckt als Stoffe die mit der viralen Replikation im Organismus interferieren, zur Übersicht siehe Schroder et al., 2004. Interferone sind Zytokine, die in der immunologischen Abwehr des Organismus gegen Pathogene von enormer Bedeutung sind (Boehm et al., 1997; Degrandi et al., 2007). Experimente haben gezeigt, dass vermutlich hunderte Gene in Folge auf die IFN- $\gamma$  Antwort in ihrer transkriptionellen Aktivität reguliert werden (Boehm et al., 1997). Sie induzieren die Expression als Teil eines antimikrobiellen zellautonomen Programmes (MacMicking, 2012).

Interferone werden in Typ I und Typ II Interferone unterteilt. Zu den Typ I Interferonen gehören Interferon  $-\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  und  $\tau$ . Das Typ II Interferon ist das Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Die virale Infektion ist der Hauptstimulus für die Sekretion von IFN  $\alpha$  und  $\beta$  (Schroder et al., 2004), die an den IFN- $\alpha$  Rezeptor (IFNAR) binden. IFN- $\gamma$  ist nicht verwandt mit Typ I Interferonen. Es bindet an den IFN- $\gamma$  Rezeptor (IFNGR). IFN- $\gamma$  gilt als eines der zentralen Moleküle der Immunantwort. IFN- $\gamma$  wird von Natürlichen Killerzellen und professionellen antigenpräsentierenden Zellen bei der frühen Immunabwehr und von T-Lymphozyten bei der adaptiven Immunantwort gebildet (Schroder et al., 2004).

Der Interferon- $\gamma$ -Rezeptor ist in der aktiven Form ein Heterodimer bestehend aus zwei Untereinheiten, IFNGR 1 und IFNGR 2. Der Rezeptor wird auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen (Boehm et al., 1997). Bei der Erforschung der IFN- $\gamma$  vermittelten Signaltransduktion kam es zur Entdeckung des Janus-Kinase (JAK)-Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)-Signalweges, welcher von einer Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen verwendet wird (Darnell et al., 1994; Ihle, 1996; Schindler and Darnell, 1995).

An den intrazellulären Domänen der IFNGR-Rezeptor-Ketten sind spezifische Janus Kinasen (JAK) konstitutiv gebunden, JAK1 an den IFNGR1 Ketten und JAK2 an den IFNGR2 Ketten (Abbildung 1). Nach Ligandenbindung erfährt die intrazelluläre Rezeptordomäne eine Konformationsänderung, welche zur Auto-phosphorylierung und

Aktivierung von JAK2 führen. Aktiviertes JAK2 führt nun zur Transphosphorylierung von JAK1 Molekülen. Die JAK1 Moleküle phosphorylieren danach spezifische Tyrosinreste der IFNGR1 Kette. Es entstehen so spezifische Bindestellen für SH2 Domänen der zytosolischen STAT1 Moleküle. Diese werden anschließend, vermutlich durch JAK1 und JAK2, wiederum phosphoryliert. Die phosphorylierten STAT1 Moleküle bilden aktive Homodimere, welche schlussendlich vom Rezeptor dissoziieren und in den Nukleus translozieren. Die STAT1 Homodimere, auch GAF (gamma-interferon activation factor) genannt, können nun durch Bindung an spezifische GAS (gamma activated site) die Transkription einer Vielzahl von Genen regulieren (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004).

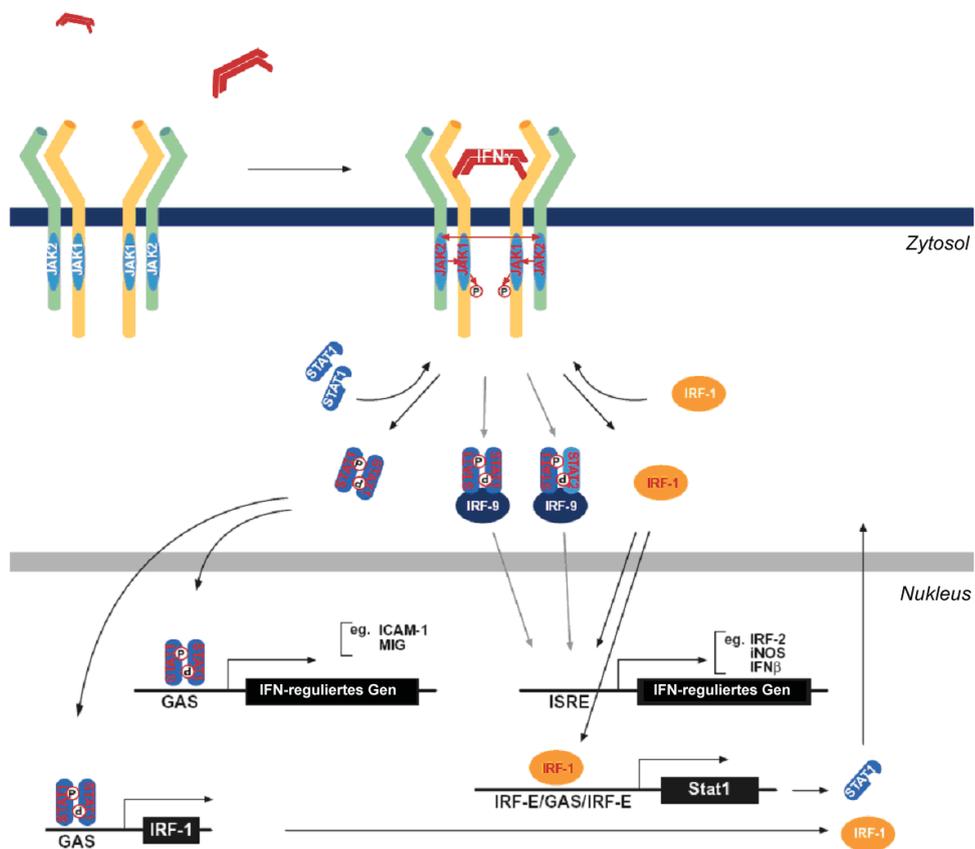


Abbildung 1 JAK-STAT Signalweg des IFN- $\gamma$  Rezeptors (aus Schroder et al., 2004)

Alternativ binden STAT1:STAT2 Heterodimere oder Heterotrimere aus STAT1:STAT2:IRF-9 (IFN regulatory factor), auch ISGF3 (Interferon stimulierter G-Faktor 3) genannt, an ISRE- (Interferon stimuliertes Response Element) Bindungsregionen. Auch diese können die Bildung von ISGs (Interferon stimuliertes Gen) fördern (Schroder et al., 2004).

Für die Inhibition der IFN- $\gamma$  vermittelten Signalkaskade existieren verschiedene Mechanismen. Hierdurch kann der Organismus Immunreaktionen beenden bzw. potentiell überschießende Immunreaktionen kontrollieren.

Nach Bindung des Liganden wird der IFN- $\gamma$ /IFNGR Komplex internalisiert. Dies kann sowohl zur kompletten Degradation des Rezeptors führen, und somit zur Verringerung der IFN- $\gamma$  Responsivität der Zelle, aber auch nur zur Degradation des Liganden. In diesen Fällen kann der IFNGR Rezeptor in seiner inaktiven Form wieder zur Zelloberfläche gelangen und für weitere Signalereignisse zu Verfügung stehen (Celada and Schreiber, 1987; Schroder et al., 2004). Eines der meist induzierten Ziele von IFN- $\gamma$  ist ein spezifischer Feedback-Inhibitor, der sogenannte SOCS-1 (supressor of cytokine signaling) Inhibitor. Dieser interferiert mit der JAK-Aktivität um nach Ligandenbindung die IFN- $\gamma$  aktivierte Signalkaskade zu inhibieren (Schroder et al., 2004).

Die zellulären Effekte von IFN- $\gamma$  sind sehr vielfältig. Dabei sind sie wichtig sowohl für die angeborene als auch für die erworbene Immunabwehr (Murphy, 2009). IFN- $\gamma$  induziert die Expression mehrerer Gene, die für die Klasse I MHC vermittelte Antigenpräsentation wichtig sind. Zudem mediert IFN- $\gamma$  in APCs, wie B-Zellen, DCs und Makrophagen, die Expression von Klasse II MHC Molekülen und kann somit die Klasse II Antigenpräsentation verstärken (Schroder et al., 2004).

Die zelluläre Antwort auf die Stimulation durch IFN- $\gamma$  ist außerordentlich komplex (Boehm et al., 1998). Es werden unterschiedliche Programme in verschiedenen Zellen durch IFN- $\gamma$  getriggert. In Makrophagen werden durch IFN- $\gamma$  verschiedene Signalkaskaden aktiviert, was die Wirkung von IFN- $\gamma$  auch schon in der angeborenen Immunabwehr zeigt. In Fibroblasten hingegen werden weniger Funktionen durch IFN- $\gamma$ -Stimulation angeregt, so beschränkt es sich hier hauptsächlich auf die Antigenpräsentation und die direkte antivirale Wirkung (Boehm et al., 1998).

Fast 2000 menschliche und murine IFN- $\gamma$  stimulierte Gene (ISGs) wurden bis heute identifiziert, die meisten von ihnen sind allerdings immer noch nicht charakterisiert (siehe auch: „Interferome database“) (MacMicking, 2012; Yamamoto et al., 2012). Die erst kürzlich durchgeführten Untersuchungen neuer beschriebener ISGs zeigen hierbei ein breit gefächertes aber durchaus integriertes Immunabwehr-Programm der Wirbeltiere (MacMicking, 2012).

Die zellulären Faktoren, welche die IFN- $\gamma$  abhängige Abwehr besonders gegen virale Erreger unterstützen, sind die Produkte der ISGs (Schoggins et al., 2011). Abhängig vom Zelltyp, der IFN Dosis und dem Stimulationszeitpunkt konnten Microarray Studien

50-1000 ISGs identifizieren, wovon 200-500 Gene typisch für viele Zelltypen sind (de Veer et al., 2001; Schoggins and Rice, 2011).

Die Effektorfunktion von ISG-codierten Proteinen zeigt sich besonders potent bei den klassischen ISGs wie zum Beispiel: PKR, MX1, oder OAS1 (Schoggins and Rice, 2011).

Als Prototyp eines Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- und IFN- $\gamma$ -koregulierten Genes wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation des Immunresponsiven-Gens-1 in murinen Makrophagen charakterisiert (Degrandi et al., 2009).

In der oben erwähnten Studie von Degrandi im Jahre 2009 wurden von 234 regulierenden Genen 35 identifiziert, welche durch Kombinationseffekte von TNF und IFN- $\gamma$  hochreguliert wurden. Die Daten lassen vermuten, dass IFN- $\gamma$  und TNF noch weitere antimikrobielle Effektormechanismen induzieren wie z.B. reaktive Stickstoff oder Sauerstoffintermediate, welche für die Kontrolle intrazellulärer Infektionen unabdingbar sind (Endres et al., 1997).

Darüber hinaus konnte für einige der 65 kDa-Guanylat-bindenden-Proteine (GBPs), welche hohe Induktion durch IFN- $\gamma$  erfahren, eine schwache antivirale Wirkung gezeigt werden (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005).

Das IFN- $\gamma$  induzierte Abwehr-Netzwerk hilft dem Wirt, sich gegen eine mannigfaltige und komplexe mikrobielle Umwelt zur Wehr zu setzen (MacMicking, 2012). Viele molekulare Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktion sind aber weiterhin nicht genau bekannt.

### **1.3. Die Dynamin Superfamilie**

Die Dynamine sind wichtig für den Transport zwischen Zellkompartimenten, da sie in das Schneiden einer großen Bandbreite von Vesikeln und Organellen, wie zum Beispiel von Clathrin-Coated-Vesikeln (CCV), Caveolae, Phagosomen und Mitochondrien involviert sind (Praefcke und McMahon, 2004). Dynamine sind auch verantwortlich für die Endozytose, indem sie Vesikel von einer Zellorganellmembran abschneiden, zu einer anderen befördern und dort fusionieren.

Dynamine besitzen eine größere GTPase-Domäne, eine Oligomerisations-abhängige GTPase Aktivität, eine geringe Bindungsaffinität zu GTP und die Fähigkeit mit Lipidmembranen zu interagieren. Somit unterscheiden sie sich von den kleinen GTPasen, wie zum Beispiel Ras-ähnlichen Proteinen (Praefcke und McMahon, 2004).

Strukturell gesehen haben Mitglieder der Dynamin-Superfamilie folgende Gemeinsamkeiten: eine große GTPase-Domäne von etwa 300 Aminosäuren, die GTP bindet und hydrolysiert, eine Mittlere-Domäne und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED, siehe Abbildung 2), welche involviert ist in die Oligomerization und Aktivierung der GTPase-Aktivität (Praefcke und McMahon, 2004).

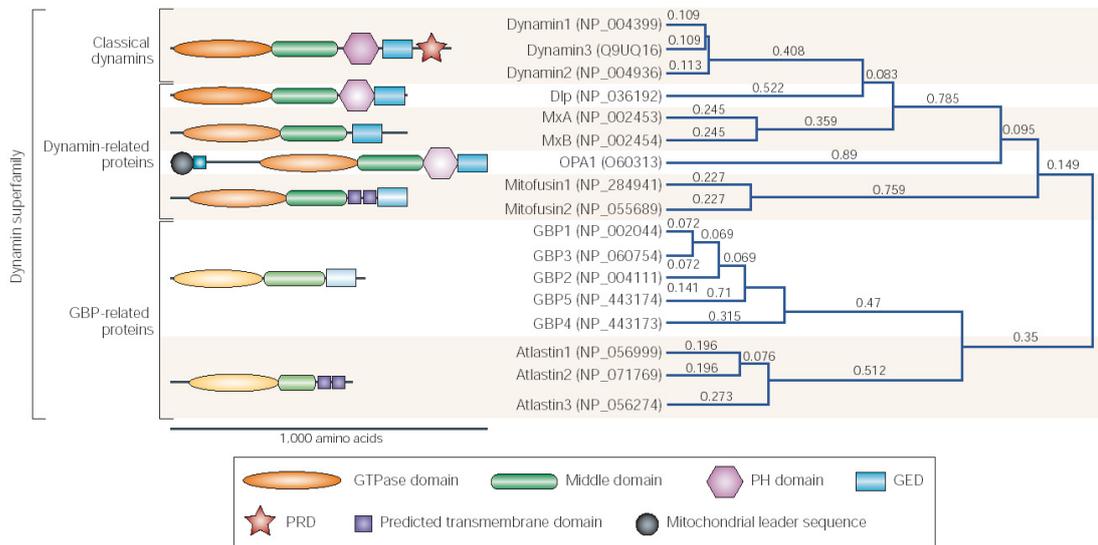


Abbildung 2 Domänenstruktur der humanen Dynamin Superfamilie (aus Praefcke und McMahon, 2004)

GBPs und IRGs (Immunity Related GTPasen) sind Enzyme, welche Guanyl-Nukleotide hydrolysieren können. Hierzu binden sie Guanostriphosphat (GTP), Guanostindiphosphat (GDP) oder Guanostinmonophosphat (GMP). Einzigartig für die GBPs ist, dass sie nicht nur GTP zu GDP, sondern auch GDP zu GMP spalten können (Schwemmler, 1996).

Die großen GTPasen gehören strukturell zur Familie der Dynamin-verwandten Proteine. Sie lassen sich, wie in Abbildung 2 dargestellt, in klassische Dynamine, Dynamin-ähnliche Proteine, Optic Atrophy 1 (OPA1), Mx-Proteine, Mitofusine und GBPs einteilen (Praefcke und McMahon, 2004). In der vorliegenden Arbeit ist das Augenmerk auf die GBPs gerichtet.

## 1.4. Die murinen Guanylat-bindenden-Proteine (mGBPs)

### 1.4.1. Struktur und Aufbau der mGBPs

Die IFN-induzierbaren GTPasen lassen sich in drei Untergruppen unterteilen: Die Gruppe der IRGs (Immunity Related GTPasen), früher bekannt als 47 kDa GTPasen,

die der Mx GTPasen und die der 65 kDa GTPasen. Die Mx GTPasen haben eine antivirale Wirkung (Staehele P., 1986). IRGs vermitteln Zell-autonome Resistenz gegen durch Protozoen und Bakterien verursachte Infektionen (Martens und Howard, 2006; Vestal, 2005).

Die Abbildung 3 zeigt den phylogenetischen Baum der Mx GTPasen, der IRGs und der 65 kDa GBPs, basierend auf deren Proteinsequenz. Die Gene der 65 kDa GBPs liegen auf zwei Clustern auf den Chromosomen 3 und 5 (Degrandi et al. 2007, Kresse et al. 2008).

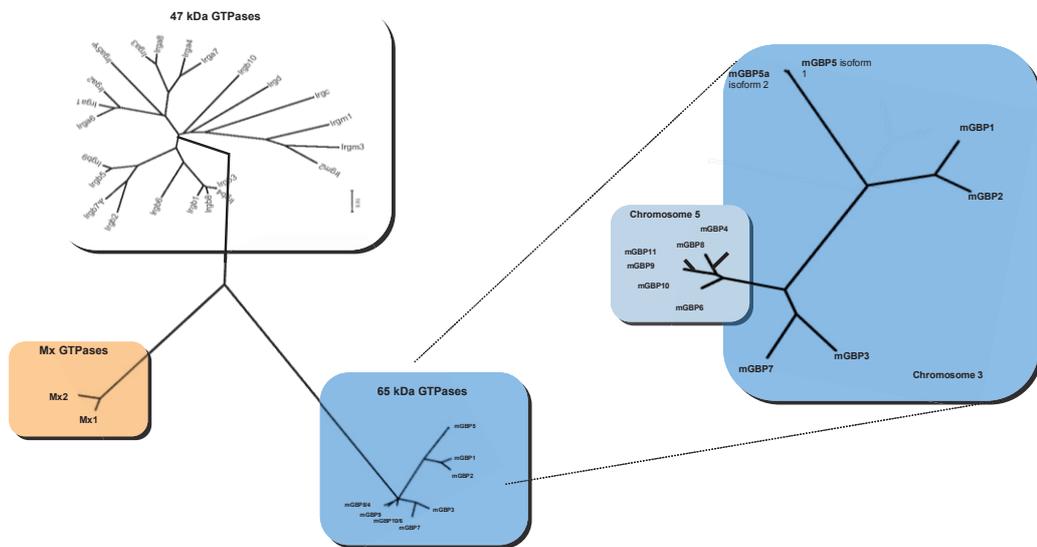


Abbildung 3 Phylogenetischer Baum der IFN- $\gamma$ -regulierten GTPasen (aus Degrandi et al., 2007)

Alle bekannten IFN- $\gamma$ -induzierbaren GTPasen gehören zu der Dynamamin-Superfamilie, so auch die 65 kDa Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) (Praefcke und McMahon, 2004).

Ursprünglich wurde im Jahre 1979 die Identifizierung eines 67 kDa Proteins aus IFN- $\gamma$  behandelten humanen Fibroblasten beschrieben (Gupta et al., 1979). Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass dieses Protein die ungewöhnliche Eigenschaft besitzt GTP-, GDP- und GMP-Agarose mit ähnlichen Affinitäten zu binden (Cheng et al., 1985; Cheng et al., 1983). Bisläng sind GBPs in Mensch, Maus, Ratte und Huhn gefunden (Asundi et al., 1994; Boehm et al., 1998; Cheng et al., 1991; Nguyen et al., 2002). Die GBP-Familien von Mensch und Maus bestehen aus untereinander auffällig homologen Genen. Die mGBPs spielen bei der zellulären Immunabwehr der Maus eine wichtige Rolle. Eigentlich sollten sie nicht in der Dynamamin-Superfamilie klassifiziert werden, da die einzige Gemeinsamkeit mit ihr die GTPase-Domäne ist (Schroder et al., 2004). Man hat die GBPs allerdings in der Gruppe belassen, da man davon ausgeht,

dass sie wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen sind (Praefcke und McMahon, 2004).

Die Expression von GBPs ist abhängig von einer Stimulation mit Typ-II-Interferon. Die Induktion wurde für Typ I IFN, Interleukin1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  und Lipopolysaccharide (LPS) beschrieben, allerdings wurde IFN- $\gamma$  als potentestes Agens nachgewiesen (Degrandi et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich die 65 kDa GTPasen untersucht. Für diese wurde bisher eine Rolle in der Resistenz gegenüber intrazellulären Pathogenen beschrieben (Degrandi et al., 2007). Hierbei wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Abwehr von Infektionen mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) oder dem viralen Erreger Zytomegalie-Virus (CMV) gelegt.

#### **1.4.2. mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen**

Gen-defiziente Mäuse haben sich als wichtige Informationsquelle herausgestellt, um die Funktion eines Genes im Kontext des Gesamtorganismus aufzuklären. Für das Gen mGBP2 wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf eine gen-defiziente Mauslinie etabliert (Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2012), die für die experimentellen Arbeiten zur Verfügung stand. mGBP2 defiziente Mäuse weisen eine erhöhte Suszeptibilität gegen *T.gondii* auf (Degrandi et al., 2013).

### **1.5. Toxoplasmose**

*Toxoplasma gondii* ist ein kleiner, einzelliger Parasit, welcher fast alle warmblütigen Tiere, eingeschlossen dem Menschen, infizieren kann (Martens et al., 2005). Toxoplasmose ist eine der am weitesten verbreiteten humanen Infektionen weltweit. *T.gondii* ist die häufigste opportunistische Infektion bei AIDS Patienten (Dubey et al., 1998).

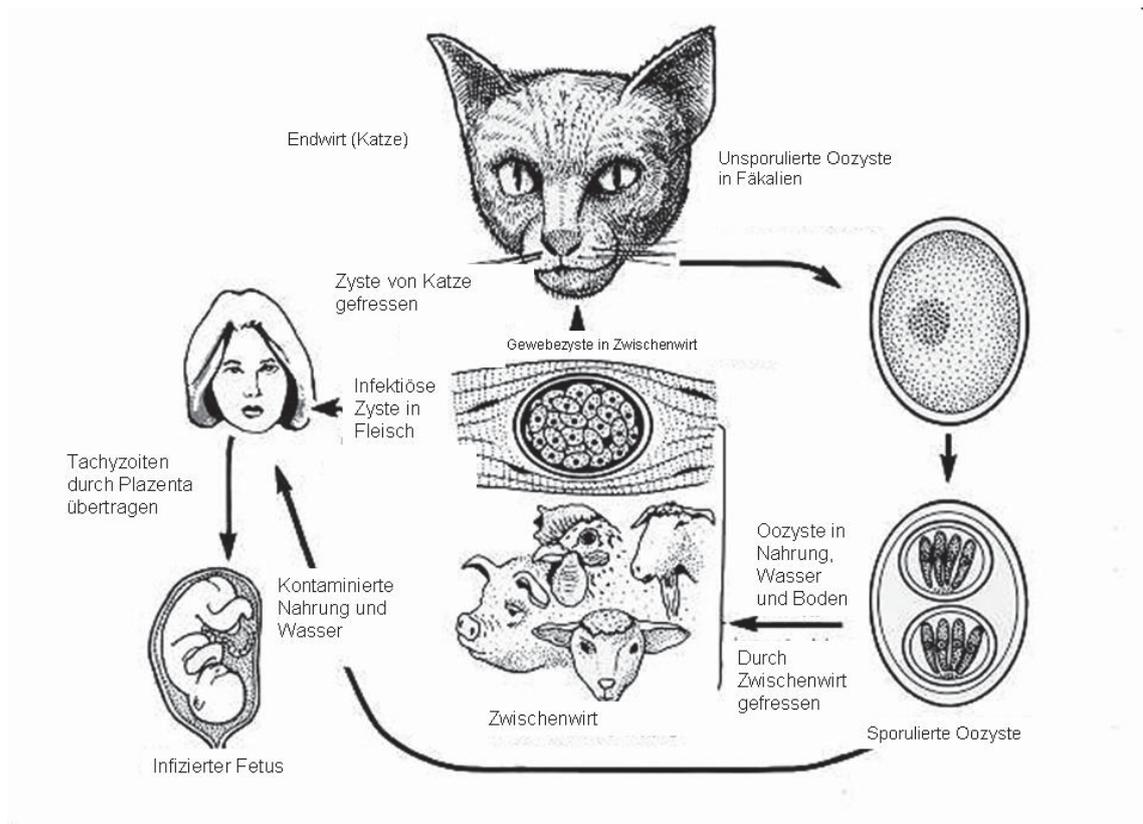


Abbildung 4 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii* (nach Dubey et al., 1998)

Die Toxoplasmose ist eine Krankheit, die über obligate Enteroparasiten *T.gondii*, übertragen wird. Der Parasit kann fast alle kernhaltigen Zellen infizieren.

Es existieren drei infektiöse Stadien: die Tachyzoiten, welche sich nach der Freisetzung aus der Wirtszelle über die Blutbahn verteilen, die Bradyzoiten in den Gewebe-Zysten und die Sporozoiten in den Oozysten. Im Zwischenwirt, wie zum Beispiel dem Menschen, existieren zwei verschiedene Stadien des Parasiten: Tachyzoiten und Bradyzoiten in den Gewebe-Zysten. Die resistente Form der Oozysten existiert nur außerhalb des Wirts (Dubey et al., 1998).

Der natürliche Wirt von *T.gondii* ist die Katze (s.Abbildung 4). Diese infiziert sich, indem sie eine der drei infektiösen Stadien aufnimmt. Sie scheidet über ihre Fäkalien die Oozysten aus. Diese gelangen über das Trinkwasser oder Futter in den Körper von Nutztieren. Auch der Mensch infiziert sich über kontaminiertes Trinkwasser oder über den Genuss von (teilweise) rohem Fleisch, welches die Gewebe-Zysten enthält.

Beim Menschen durchtritt der Parasit nach der Aufnahme zuerst die Darmwand und wird danach über Lymph- und Blutbahn weitertransportiert. *T.gondii* bleibt nicht nur in den extrazellulären Flüssigkeiten so wie dem Blut, sondern dringt auch aktiv in die Körperzellen ein (Hunter und Sibley, 2012).

Nach der Invasion in die Wirtszelle repliziert sich der Parasit schnell in seiner parasitophoren Vakuole (PV). In diesem Stadium heißt die Form der Parasiten Tachyzoit. Die Replikation führt zur Lyse der infizierten Zelle und der Infektion von benachbarten Zellen (Sibley, 2011).

Nach der schnellen Replikation kann die Immunabwehr zur Bildung von Gewebekysten führen, welche die langsam replizierenden Bradyzoiten beinhalten und sich im Skelettmuskel, im Gehirn und im Auge manifestieren. Auf diese Art und Weise wird eine latente Infektion etabliert (Dubey et al., 1998).

Die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt führt zu einer massiven Hochregulation der antimikrobiellen Wirt-Effektor-Moleküle wie zum Beispiel der Interferone (Hunter und Sibley, 2012).

In Studien wurde belegt, dass sich das Fluchtverhalten von Mäusen ändert, wenn sie mit *T.gondii* infiziert sind (Vyas et al., 2007). Mäuse, welche mit *T.gondii* infiziert sind, reagieren anders auf den Geruch von Katzen als uninfizierte Mäuse. Anstatt zu fliehen finden die infizierten Mäuse den Geruch der Katze (Pheromone) eher anziehend und nähern sich der Katze. Dies könnte ein evolutionärer Vorteil der Parasiten für das Überleben sein. Die Parasiten sorgen dafür, dass der parasitäre Kreislauf nicht unterbrochen wird, da sie zum Überleben abhängig von der Verbreitung ihrer selbst durch andere sind (Vyas et al., 2007). Sind die infizierten Mäuse leichte Beute, werden sie gefressen und die Katze infiziert sich mit *T.gondii*. Man vermutet also, dass der Parasit sich im Kreislauf mit Katze und Maus entwickelt hat.

Beim Menschen, der lediglich einen Zwischenwirt für den Parasiten darstellt, ist die klinische Manifestation bei immunkompetenten Individuen ähnlich einer infektiösen Mononukleose (Ho-Yen, 1990). Es ist schwierig, den Unterschied zu einer Epstein-Barr-Virus Infektion zu diagnostizieren. Lediglich ein Bluttest bringt Sicherheit.

Die drei Erscheinungsformen der *T.gondii* Infektion sind die postnatale, die reaktivierte und die konnatale Toxoplasmose (Hof, 2009). Die postnatale Toxoplasmose ist eine Infektion im immunkompetenten Patienten und zeichnet sich durch unspezifische Symptome wie Lymphknotenschwellung, Abgeschlagenheit, Gliederschmerzen und Fieber aus; in schweren Fällen kann auch eine Hepatitis, Myokarditis, Pneumonie oder Enzephalitis hervorgerufen werden (Hof, 2009). Die reaktivierte Toxoplasmose zeigt, dass eine klinisch unauffällige Toxoplasmose bei Immunsuppression (z.B. AIDS) als klinisch manifeste Krankheit auftreten kann. Hierbei können die Symptome Enzephalitis, Pneumonie und Myokarditis sein (Hof, 2009).

Besonders gefährlich ist eine Infektion für den Menschen in der Schwangerschaft; eine transplazentäre Infektion des Embryos führt zu schweren Missbildungen oder sogar zum Abort (Murphy, 2009). Die konnatale Toxoplasmose unterscheidet sich also nach dem Zeitpunkt der Infektion der Mutter. Geschieht die Infektion im 1. Trimenon der Schwangerschaft führt dies meist zum Abort. Im 2. und 3. Trimenon führt die Infektion zur Frühgeburt oder zu einer Fetopathie (Hof, 2009). Die Organmanifestationen im zentralen Nervensystem und im Auge stellen sich als Hauptprobleme dar. Die klassische Trias der konnatalen Toxoplasmose wird gebildet aus Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und Chorioretinitis (Hof, 2009).

Als Therapie werden Kombinationspräparate aus Sulfonamiden und Pyrimethaminen verwandt. Beide Wirkstoffe verhindern die Vermehrung der Parasiten. Diese Medikamente dürfen, bei einer während der Schwangerschaft auftretenden Infektion, erst nach der 15. Schwangerschaftswoche verwendet werden. In den ersten Wochen der Schwangerschaft wird eine Infektion mit dem Antibiotikum Spiramycin behandelt (Hof, 2009).

## **1.6. Zytomegalie**

### **1.6.1. Humaner und Muriner Stamm**

Das Zytomegalievirus ist sehr stark Spezies-spezifisch (Trilling et al., 2011). Das murine Virus (MCMV), das der Gruppe der  $\beta$ -Herpesviridae angehört, infiziert *Mus musculus* als natürlichen Wirt und ist sehr stark verwandt mit dem human-pathogenen Zytomegalievirus (HCMV), welches auch der Gruppe der  $\beta$ -Herpesviridae angehört (HCMV ist das humane Herpesvirus 5 (HHV-5)). Beide rufen eine chronische Infektion hervor (Trilling et al., 2011).

HHV-5 hat mit einer 235 Kilobasen Doppelstrang-DNA das größte Genom unter den Herpesviridae (Doerr, 2010). Die Durchseuchung bei gesunden Erwachsenen in Deutschland liegt bei 50-70%, die Krankheit verläuft jedoch fast immer asymptomatisch (Doerr, 2010). In weniger entwickelten Ländern liegt die Seropositivität bei bis zu 100% (Doerr, 2010).

Die Infektion mit HCMV ist einer der Hauptgründe für Fehlbildungen des Neugeborenen auch in den westlichen Nationen, da das Virus transplazentär von der Mutter zum Kind weitergegeben werden kann (Doerr, 2010). HCMV ist zudem gefährlich für immunsupprimierte Patienten, wie zum Beispiel AIDS-Patienten, Diabetiker oder Organtransplantierte (Hof, 2009).

Die Übertragung von HCMV erfolgt über Speichel, Muttermilch, Sexualsekret, Urin und Blut (Doerr, 2010). Die Infektion mit HCMV lässt sich im ganzen Körper nachweisen, jedoch manifestiert sich die Erkrankung zuerst in den Speicheldrüsen der Patienten, histologisch lassen sich dort die sogenannten Eulenaugenzellen nachweisen (Doerr, 2010). Danach zeigt sich die Erkrankung auch im restlichen Körper. Meist zeigen sich Symptome wie Fieber, Lymphknotenschwellung, Kopf- und Gliederschmerzen ähnlich wie bei einer Mononukleose (Doerr, 2010). Tritt die Infektion während der Schwangerschaft auf, so können sich folgende Erkrankungen am Neugeborenen manifestieren: Chorioretinitis, Mikrozephalus, intrazerebrale Verkalkungen, Petechien, Hepatitis, Myokarditis, Enterokolitis, Zytomegalie der Niere, Pneumonie, Encephalitis (Doerr, 2010; Hof, 2009).

Die meisten Infektionen mit HCMV verlaufen inapparent. Besonders die Erstinfektion verläuft subklinisch und wird somit oft nicht als eine CMV-Infektion erkannt (Doerr, 2010). Bei dieser Erstinfektion kommt der seronegative Patient mit dem Virus das erste Mal in Kontakt. Das Virus persistiert allerdings lebenslang im Körper (Doerr, 2010), es etabliert sich im Sinne einer chronischen Infektion. Diese Phase heißt Latenzphase und hält solange an, bis durch Immunsuppression oder andere Stimuli das Virus reaktiviert wird und eine Infektion hervorruft. Die Sekundär-Infektion geschieht, wenn ein ehemals infiziertes Individuum eine Reaktivierung einer früheren CMV-Infektion erfährt oder wenn es zu einer Reinfektion mit einem anderen CMV-Stamm kommt.

An der Universität Prag wurde 2005 eine Studie veröffentlicht, welche sich mit den Auswirkungen einer CMV- oder auch einer *T.gondii*-Infektion auf die Persönlichkeit beschäftigte (Novotna et al., 2005). Es wird vermutet, dass die Neugier der Patienten abnimmt und eine generelle Antriebslosigkeit durch die Infektion mit *T.gondii* oder CMV eintritt. Die Forscher vermuten, dass aufgrund der Infektion im Gehirn (bei einer CMV-Infektion) eine erhöhte Dopaminsekretion auftritt, welche die Neugier beeinflussen könnte (Novotna et al., 2005).

Als Medikation bei einer CMV-Infektion hat sich die Behandlung mit Ganciclovir, Cidofovir, Foscavir oder Maribavir bewährt (Doerr, 2010).

Zum Studium von HCMV Infektion hat sich als geeignetes Modell die Infektion der Maus mit dem murinen Zytomegalievirus gezeigt (Mocarski ES, 2007).

Auch hierbei spielt die IFN-Regulation der Immunabwehr eine große Rolle, welche im Folgenden genauer untersucht werden sollte. Zum Beispiel kontrolliert eine koordinierte Immunantwort der Interferone mit T-Zellen und NKs die MCMV Reaktivierung aus der Latenzphase in vivo (Polic B, 1998).

### 1.6.2. MCMV Luciferase-Stamm

Zur Bestimmung der CMV Replikation in mGBP2<sup>+/+</sup> Zellen und mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen wurde ein MCMV-Stamm ( $\Delta$ m157-MCMV:luciferase, siehe Trilling et al., 2011) verwendet, welcher eine Luciferase Reporter-Gen Kasette trägt. Anstatt des m157-Genes exprimiert dieses CMV-Virus ein Luciferase-Gen. Nach Zugabe von Luciferin lässt die gemessene Lumineszenz indirekt Rückschluss auf die Anzahl der Virenpartikel im Zelllysat zu (Trilling et al., 2011).

## 1.7. Zielsetzung

Die Funktion der murinen Guanylat- bindenden Proteine (mGBPs) bei der Erregerabwehr wurde bisher nur unzureichend geklärt. Bisher wurden zehn funktionale Proteine dieser Familie in der Maus beschrieben (Degrandi et al., 2007; Konermann et al., 2007; Kresse et al. 2008). Für den Menschen existieren sieben homologe Gene in der Datenbank, wobei das aktuell am besten untersuchte das humane GBP1 (hGBP1) ist.

In der Erforschung der Funktion der mGBPs sind noch viele Fragen offen. mGBP2 wurde eine von IFN- $\gamma$ -Stimulation abhängige anti-infektiöse Wirkung gegen *T.gondii* zugeordnet (Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013); jedoch ist der genaue Wirkmechanismus bisher nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Fragestellungen bearbeitet. Zunächst ging es darum, zu klären, ob bei einer *T.gondii* Infektion die verschiedenen mGBPs an der parasitophoren Vakuole (PV) autonom oder synergistisch wirken. Weiterhin wurde die antivirale Funktion von mGBP2 erforscht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob es im Zuge einer *T.gondii* Infektion zu bestimmten Kollokalisationsmustern der verschiedenen mGBPs an der PV kommt. Dabei stellte sich die Frage, ob die mGBPs unterschiedlich an der *T.gondii* PV rekrutiert werden. Dieses sollte durch gezielte Untersuchung jeweils eines Paares von mGBPs im selben Experiment dargestellt werden. Hierzu wurde, durch die Kombination von GFP-mGBP2, GFP-mGBP7 und GFP-mGBP9 Fusionskonstrukten und verfügbarer Antikörper gegen mGBP1 und mGBP2, eine große Variation erzielt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte analysiert werden, ob es eine antivirale Wirkung von mGBP2 gegen MCMV gibt. Vorherige Versuche konnten zeigen, dass nach einer IFN- $\gamma$  Stimulation und einer MCMV-Infektion die mGBP2 exprimierenden murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) mGBP2 weiterhin exprimieren (Konermann, Trilling, unveröffentlichte Daten). Durch den Einsatz eines Luciferase-Assay-Systems in MCMV-infizierten mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs sollte die Replikation von CMV in der An- und Abwesenheit von mGBP2 untersucht werden. Gleichzeitig sollte mit Hilfe von Western-Blotting herausgefunden werden, ob die MCMV Infektion einen Einfluss auf die Integrität des mGBP2-Proteines nimmt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
$\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe Gibco, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Molecular Probes, USA
DMSO	GE Healthcare, München
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)	Gibco, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	BD Biosciences, Heidelberg
FKS (Fötales Kälberserum)	Cambrex Corporation
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCL Salzsäure	Merck, Darmstadt
HRP (Meerrettichperoxidase)	Roth, Karlsruhe
IFN- $\gamma$ , murin	R&D Systems, Wiesbach- Nordenstadt
IMDM Medium	Bio Whittaker, Lonza, Belgien

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Oxoid, Hampshire, England
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roche, Mannheim
Saponin	Calbiochem-Merck, Darmstadt
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Ultrapure H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	DaKoCytomation, Hamburg

Tabelle 1 Chemikalien

### 2.1.2. Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-β-Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-mGBP1.2 (RQEIEKIKNMPPPRSC)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP2 (EVNGKPVTSDEYLEHC)	Eurogentec, Belgien
Anti-mGBP3.2 (CLREEMERTRRKPSLF)	Eurogentec, Belgien
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> [TP3] (SAG1)	Abcam, Cambridge, UK
CyTM2 Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
CyTM3 Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Alexa 633 Anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Karlsruhe
Goat Anti-Mouse POX	Dianova, Hamburg
Goat Anti-Rabbit IgG POX	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 2 Antikörper

### 2.1.3. Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenz	Bezugsquelle
Bis-Tris SDS-Gele (4-12%)	Invitrogen, Karlsruhe
Deckgläschen: Microscope Coverslips	VWR, Darmstadt
Filme: Hyperfilm™-ECL	GE Healthcare, München
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Dassel
Kanülen	BD Pharma, Heidelberg
Küvetten	Brand, Wertheim

Native Bis-Tris Gele NativePAGE™ (4-16%)	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrocellulose Membran Protan BA85	Whatman, Dassel
Objektträger	VWR, Darmstadt
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	BD Falcon, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
Rotiphorese® Gel 30% Acrylamid/Bisacrylamid	Stratagene, Californien
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
Spritzen	Sartorius, Göttingen
Ultrazentrifugenröhrchen	Invitrogen, Karlsruhe
	Beckman Coulter, Krefeld

Tabelle 3 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

#### 2.1.4. Geräte

Gerät/Bezeichnung	Hersteller
Abzug	wrt-Laborbau, Stadtlohn
Analysenwaage, Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Analysenwaage ABT 120 5 DH	Kern, Buchholz
Brutschrank, BBD6220: Eukaryotische Zellen	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank: Bakterienplatten: function line	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank: <i>E. coli</i> Kulturen	Ecotron, Heraeus Instruments, Hanau
MultitronStandard	
Digitalkamera, Powershot G2	Canon, Amsterdam, Niederlande
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln
Gefrierschrank -80°C Ultra Low	Sanyo, San Diego, CA , USA
Heizofen, OV3	Biometra, Göttingen
Konfokalmikroskop, LSM510 Meta	Zeiss, Oberkochen

LSM780	Zeiss, Oberkochen
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Microplate Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Pipetten	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pipettierhilfe (Pipet-Boy, accu-jet)	Brand, Wertheim
Proteintransfer-Apparatur (Transblot SD)	Bio-Rad, München
Sterilbank, HLB 2472 GS	Heraeus, Hanau
SDS-PAGE Gelsystem für Biochemie	Bio-Rad, München
Tischzentrifugen	
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415 C, miniSpin	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Waage Precisa 600	Oehmen, Essen
Waage EMB 2200-0	Kern, Buchholz
Wasserbad WNB22	Memmert, Schwabach
Zellkulturschüttler, 3015	GFL, Burgwedel

Tabelle 4 Geräte

### 2.1.5. Stammlösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Blockierlösung für Immunfluoreszenz	2%	Ziegenserum in 10% Permeabilisierungslösung
DAPI Lösung	1:2500	in PBS
Fixierlösung für Zellen für Immunfluoreszenz	4%	PFA in PBS
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl

	80,9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,4
Permeabilisierungslösung	0,02%	Saponin in PBS
TBS-T	150mM	NaCl
	10mM	Tris/HCl
	0,1%	Tween 20
		pH 7,6
WB Auftragspuffer (5 x) für Invitrogen-Gele	45%	Glycerin
	25%	β-Mercaptoethanol
	10%	SDS
	0,15%	Bromphenolblau
	30 mM	Tris/HCl
		pH 6,8
WB Lysepuffer	140 mM	NaCl
	20 mM	Tris/HCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1%	NP-40
	1	Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette pro 10 mL auflösen (EDTA frei) (Roche)
	1	PhosSTOP Tablette pro 10 mL auflösen (Roche)

	5 mM	NaF
	2,5 mM	PMSF
		pH 7,6
WB Laufpuffer (20 x) Invitrogen- SDS-Gele	50 mM	MOPS
	50 mM	Tris Base
	1 mM	EDTA
	0,1% (w/v)	SDS
		pH 7,7
WB Transferpuffer	25 mM	Bicine
	25 mM	Bis/Tris
	1 mM	EDTA
	20%	Methanol

Tabelle 5 Stammlösungen und Puffer

### 2.1.6. Medien für die Zellkultur

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

Tabelle 6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

### 2.1.7. Toxoplasmen- und Virenstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
MCMV + Luciferase-Transporter-Gen	$\Delta$ m157-MCMV:luciferase	(Trilling et al., 2011)
<i>T. gondii</i> ME49, Typ II	obligat intrazellulär replizierender Einzeller	(Parmley et al., 1994)

Tabelle 7 Verwendete Erregerstämme

### 2.1.8. Zelllinien

Zellen	Eigenschaften	Referenz
HS27/HFF	humane Vorhaut Fibroblasten	ATCC, CRL-1634™
mGBP2 <sup>-/-</sup> EF	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 p.c. aus mGBP2 <sup>-/-</sup> C57BL/6 Embryonen	frisch isoliert, (Dissertation C. Konermann, 2008)
NIH 3T3	murine embryonale Fibroblasten Zelllinie	ATCC, CRL-1658™

Tabelle 8 Verwendete Zellen

### 2.1.9. Kits und Verbrauchsmaterial

Luciferase Reporter Gene Assay KIT

Roche, Penzberg

### 2.1.10. Computerprogramme

Für die Auswertung von Daten wurden folgende Programme verwendet:

GraphPad Prism® 5	GraphPad Software Inc., USA
Adobe Illustrator, Adobe Photoshop	Adobe
ZEN 2011	Zeiss Microscope Software

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Standard t-Tests für gepaarte Daten. Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aufgeführt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen wurden als signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$  gegeben war.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Allgemeine Zellkultur**

Die Zellkulturarbeiten wurden mithilfe steriler Materialien und Lösungen an Sterilbänken (Hereaus, Hanau) mit HEPA-Filtern durchgeführt. Alle Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

### **2.2.2. Kultivierung von Zelllinien**

NIH 3T3-Zellen und MEFs wurden alle 2 Tage passagiert, indem sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in DMEM-Medium verdünnt auf neue Platten ausplattiert wurden. HS27 Zellen, zur Kultivierung von Toxoplasmen, wurden in T75 Flaschen (Nunc) bis Passage 40 passagiert. Von konfluent bewachsenen Flaschen wurde einmal wöchentlich das IMDM-Medium gewechselt. Dicht bewachsene T75 Flaschen wurden gesplittet, indem die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend kurz mit Trypsin/EDTA behandelt und für 10 min im Brutschrank inkubiert wurden. Die Reaktion wurde mit IMDM-Medium abgestoppt. Vereinzelte Zellen wurden 1:6 in T25 Flaschen umgesetzt. Die Proben wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet. Dabei wurden immer negative Ergebnisse erhalten.

### **2.2.3. Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl wurde nach Anfärben der toten Zellen mit 0,16% Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### **2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die NIH 3T3-Zellen wurden zuerst kultiviert und dann vor dem Einfrieren mit Trypsin/EDTA vereinzelt. Schließlich wurde die Reaktion mit DMEM-Medium abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1200 UpM (Megafuge) abzentrifugiert und der Überstand entfernt.  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (40% FKS, insgesamt, 10% DMSO) aufgenommen, in Cryotubes aliquotiert, für 30 min bei -20°C inkubiert und dann Ü/N bei -80°C gelagert. Zur längeren Konservierung der Zellen wurden die Cryotubes anschließend in flüssigen

Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C. Die Zellen wurden einmal in vorgewärmtem DMEM-Medium gewaschen, um sie von DMSO zu befreien und danach in Medium ausgesät.

### **2.2.5. Stimulation von Zellen**

Die Zellen wurden nach 8 h Wachstum für 16 h mit 100 U/ml murinem IFN- $\gamma$  (R&D) behandelt. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe zum Medium.

### **2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung**

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden NIH 3T3-Zellen am Vortag in 24-Well-Platten auf sterilen 13 MM Glasdeckelchen im DMEM-Medium ausgesät. Am Tag der Färbung wurde bei nicht infizierten und *T.gondii*-infizierten Zellen das Medium unter der Sterilbank abgenommen. Die Zellen wurden zunächst für 5 min unter Schwenken in PBS gewaschen, anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in 4% Paraformaldehyd (PFA) im Dunkeln auf einem Schüttler fixiert und nochmals für 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,02% Saponin/PBS für 15 Minuten bei RT abgedunkelt permeabilisiert. Anschließend wurde mit 0,002% Saponin/PBS + 2% Ziegen Serum 20 min bei RT abgedunkelt geblockt. Zur Inkubation der Zellen mit einem Primärantikörper wurde dieser in 0,0002% Saponin/PBS + 0,2% Ziegen Serum verdünnt und für 1 h bei RT abgedunkelt und unter Schwenken inkubiert. Dieser wurde für 1:700 für Sag1, 1:200 für mGBP-Antikörper im Verhältnis gemischt. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal 5 min mit 0,0002% Saponin/PBS gewaschen und mit einem Sekundärantikörper, verdünnt in 0,0002% Saponin/PBS + 0,2% Ziegen Serum, für 45 min bei RT im Dunkeln unter Schwenken inkubiert. Dieser wurde im Verhältnis 1:200 gemischt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden die Zellkerne in DAPI Lösung (1:2500 in PBS verdünnt) 3 min bei RT gefärbt und anschließend wieder mit PBS für 5 min gewaschen. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden mit Fluoromount-G auf Objektträger fixiert und bei 4°C aufbewahrt.

### **2.2.7. Kultivierung von *T. gondii***

Zur Vermehrung der Typ II ME49 *T.gondii* wurden die Parasiten in T25 Zellkulturflaschen mit einem Monolayer von HS27 oder HFF Fibroblasten im IMDM-Medium kultiviert. Nach Vermehrung der Toxoplasmen wurde der Überstand abgenommen, bei 50 x g (600 UpM) und 32°C 5 min zentrifugiert und wiederum der Überstand abgenommen. Bei einer weiteren Zentrifugation des Überstandes mit 600 x

g (1800 UpM) für 15 min bei 32°C wurden die Parasiten pelletiert. Diese wurden anschließend in frischem IMDM-Zellmedium resuspendiert. Für die weitere Passage wurden  $0,5-1 \times 10^6$  Parasiten in eine T25 Zellkulturflasche mit HS27/HFF Fibroblasten gegeben.

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

Die NIH 3T3-Zellen ( $3 \times 10^4$  Zellen/Well) wurden auf Glasplättchen in 24-well-Platten ausgesät und im Brutschrank Ü/N inkubiert. Nach 8 h wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen im Verhältnis 1:50 (Zellen:Parasiten) mit *T.gondii* (Stamm ME49) für 2 h inkubiert.

Die Toxoplasmen wurden direkt nach der Infektion 1 Minute bei 2000 UpM in der Zentrifuge auf die Zellen im Präparat herunterzentrifugiert.

### **2.2.9. In-vitro Infektion mit MCMV**

Die mGBP2<sup>+/+</sup> und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs ( $2 \times 10^4$  Zellen/Well) wurden auf 24-Well-Platten ausgesät. Nach 4 h wurden die MEFs mit IFN- $\gamma$  (100 U/Well) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Danach wurden sie im Brutschrank Ü/N inkubiert.

Nach 20 h wurden die MEFs mit MCMV (Luciferase-Stamm, siehe 1.6.2) entweder mit einer MOI von 0,05 oder von 5 infiziert und für 1-8 Tage inkubiert.

### **2.2.10. Luciferase-Assay**

An Tag 1-8 post infectionem wurden die MEFs auf der jeweilige 24-Well-Platte einmal mit PBS gewaschen, mit 100  $\mu$ l Luciferasepuffer/Well (Roche) versehen und bei -80°C gelagert.

Alle Proben wurden am Ende der Versuchsreihe auf Eis aufgetaut und auf eine 96-Well-Platte überführt (50  $\mu$ l/Well). Dies wurde auf Eis durchgeführt, um eine verfrühte Reaktion der Luciferase zu unterbinden. Anschließend erfolgte die Zugabe von Luciferin (100  $\mu$ l/Well (Fa.Roche)).

Die Daten wurden direkt im Anschluss im Microplate Luminometer (Berthold Technologies) ausgewertet.

### 2.2.11. Western Blot

Die Technik des Western Blottings dient dazu, die in einem Gel aufgetrennten Proteine über einen Transfer (z.B. Elektrotransfer) auf eine Trägermembran (z.B. Nitrocellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membran) zu übertragen und für die nachfolgende Immundetektion mittels spezifischer Antikörper zu immobilisieren. Im Anschluss an eine SDS-PAGE-Gelelektrophorese erfolgte der Elektrotransfer der auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit dem Transfergerät Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Dafür wurden das Gel, die Membran und das Filterpapier (Whatman 3 MM) kurz im Transferpuffer mit 20% Methanol äquilibriert. Danach wurden auf die mit Transferpuffer befeuchtete Anoden-Graphitplatte die Komponenten folgendermaßen luftblasenfrei geschichtet:

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

Die Transferzeit betrug 2 h bei 40 mA pro Gel. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT in 5% Milchpulver oder in 5% BSA mit 0,2% Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), jeweils gelöst in TBS-T, blockiert, um eine unspezifische Proteinbindung des Antikörpers zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde in 3% Milchpulverlösung oder 5% BSA nach Angaben des Antikörperherstellers verdünnt und Ü/N bei 4°C mit der Membran bei langsamen Rollen in Falcon-Röhrchen inkubiert. Nachdem die Membran dreimal für jeweils 5 min in TBS-T gewaschen worden war, um unspezifisch gebundenen primären Antikörper zu entfernen, erfolgte anschließend die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten und ebenfalls in 3% Milchpulver-TBS-T gelöstem sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in TBS-T bei RT gewaschen. Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers und somit des Proteins von Interesse erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (GE Healthcare). Die Membran wurde mit der Detektionslösung im Dunkeln benetzt, 3 min inkubiert und anschließend in eine Plastikfolie gelegt. Die spezifischen Signale wurden durch Exposition und Entwicklung der, durch Chemolumineszenz belichteten, speziellen Filme (ECL Hyperfilm, GE Healthcare) detektiert.

### **2.2.12. Anti- $\beta$ -Aktin Lade-Kontrolle**

Der entwickelte Western-Blot wird mit dem Anti-Maus- $\beta$ -Aktin-Antikörper inkubiert und erneut entwickelt. Die  $\beta$ -Aktin Bande sollte bei ca.40 kDa liegen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Kolokalisationsstudien von murinen Guanylat-bindenden-Proteinen

Zu Beginn der Arbeit wurden Immunfluoreszenzfärbungen erstellt, welche zeigen sollen, ob und wie mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP7 und mGBP9 an der PV von intrazellulären *T.gondii* kolokalisieren.

Es wurden hierfür NIH-3T3 Zellen, welche GFP-mGBP2 bzw. GFP-mGBP7 oder GFP-mGBP9 stabil exprimieren, mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  16 h über Nacht stimuliert und anschließend für zwei Stunden mit *T.gondii* (Stamm ME49, Verhältnis Zellen:Parasiten 1:50) infiziert. Für mGBP1, mGBP2 und mGBP3 wurden nach IFN- $\gamma$  Stimulation die endogenen Proteine mittels spezifischer Antisera gefärbt (DeGrandi et al., 2007).

Nach Fixierung, Permeabilisierung und Blockierung wurden die Zellen mit einem, für ein mGBP spezifisches Primärserum, und einem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper gefärbt.

Der neue Experimentalansatz der Färbungen war, dass neben dem jeweiligen GFP-mGBP-Fusionsprotein, welches bereits stabil von der NIH-3T3 Zelllinie exprimiert wurde, auch ein weiteres mGBP mit einem spezifischen Antikörper angefärbt wurde. Somit ergibt sich die Möglichkeit, die Reaktion zweier unterschiedlicher mGBPs auf die Infektion mit *T.gondii* in einer Zelle zu zeigen.

Als Versuchsaufbau wurde festgelegt, GFP-mGBP2, GFP-mGBP7 oder GFP-mGBP9 exprimierende Zellen in Kombination mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern für mGBP1, mGBP2 und mGBP3 zu färben. Hierbei wurde eine möglichst große Kombination an Färbungen und Kontrollen hergestellt. Es zeigte sich aber, dass die Auswahl an Antikörpern für die Sekundärfärbung von mGBPs eine Einschränkung zur umfassenden Analyse der mGBP-Interaktivität darstellte. Lediglich die Antikörper gegen mGBP1 und mGBP2 zeigten eine ausreichend gute und spezifische Färbequalität. Eine aussagekräftige Färbung von mGBP3 mit dem mGBP3 Antikörper war für die Immunfluoreszenzdetektion nicht möglich (siehe Abbildung 5).

Nachdem die Färbungen wie auf dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt worden waren, wurden die Präparate mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Bei der Analyse zeigten die in Abbildung 5 dargestellten Immunfluoreszenzfärbungen, dass es unter IFN- $\gamma$ -Stimulation eine Kolokalisation der verschiedenen mGBPs an der PV von

*T.gondii* gibt. Es konnte eine Kolokalisation von mGBP9 sowohl mit mGBP1 als auch mit mGBP2 an der PV beobachtet werden. Auch für mGBP7 zeigte sich eine Kolokalisation an der PV, ebenfalls mit mGBP1 und mGBP2. Auch für mGBP2 ließ sich eine Kolokalisation mit mGBP1 nachweisen. Bei den meisten Versuchen zeigte sich, dass sowohl das endogen gefärbte mGBP als auch das heterolog exprimierte GFP-mGBP an der gleichen PV angelagert waren. Jedoch ließen sich ebenso PVs beobachten, die nur jeweils eines der untersuchten mGBPs angelagert hatten. Im Folgenden wird auf die einzelnen Unterschiede gezielt eingegangen.

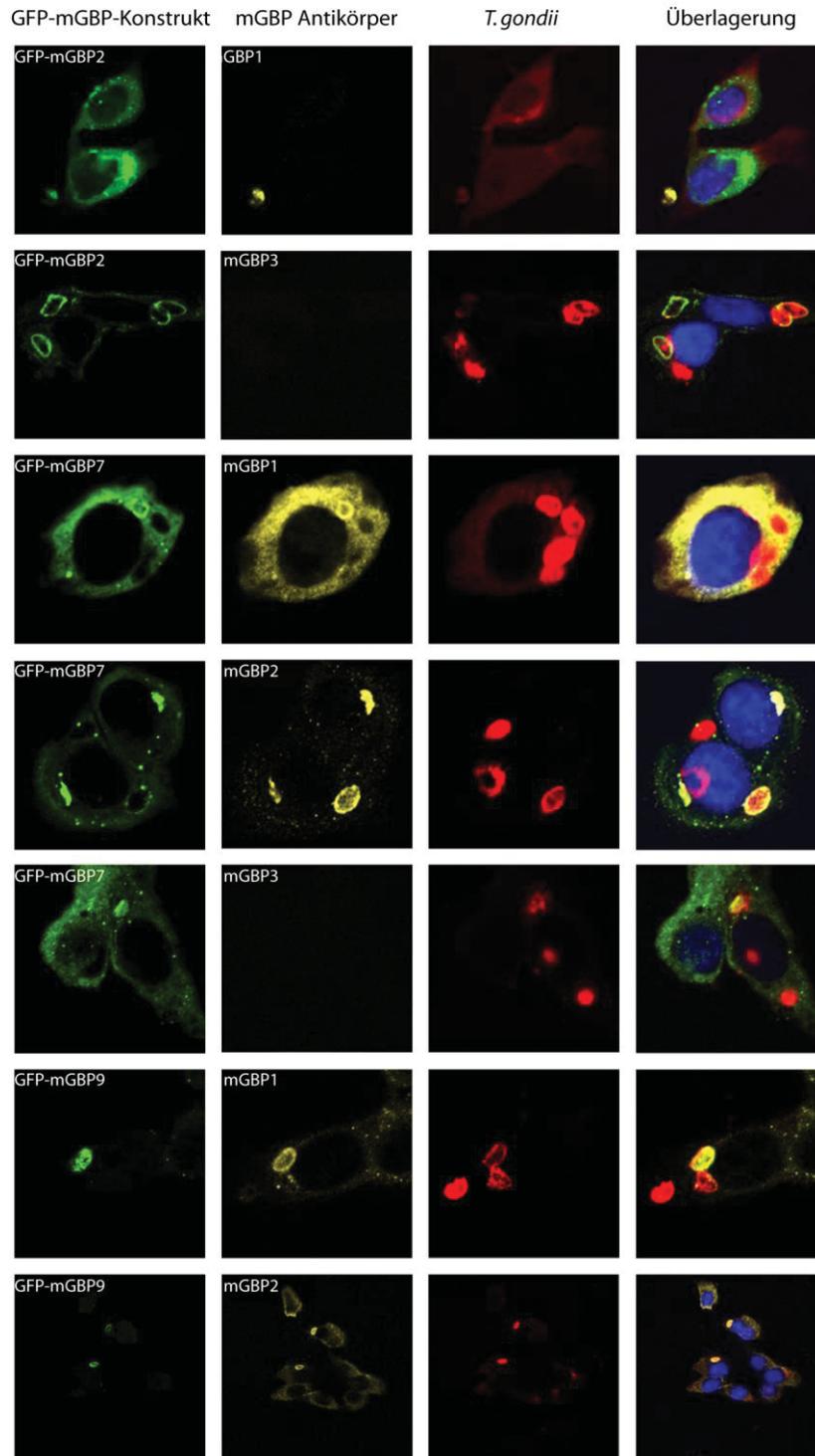


Abbildung 5 mGBP-Kolokalisationsstudien unter IFN- $\gamma$  Stimulation mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, 63-fache Vergrößerung.

Es zeigt sich die subzelluläre Lokalisation von unterschiedlichen GFP-mGBPs in NIH-3T3 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation (16 h). In grün zeigt sich das GFP-mGBP-Protein, die Kofärbung mit einem mGBP-spezifischen-Cy3-gekoppeltem Antikörper wird in gelb dargestellt. Die Färbung der Toxoplasmen wurde mittels SAG-1 spezifischem Antikörper mit Detektion durch einen  $\alpha$ -Maus-Alexa 633 Antikörper in rot dargestellt. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse von 3 Experimenten.

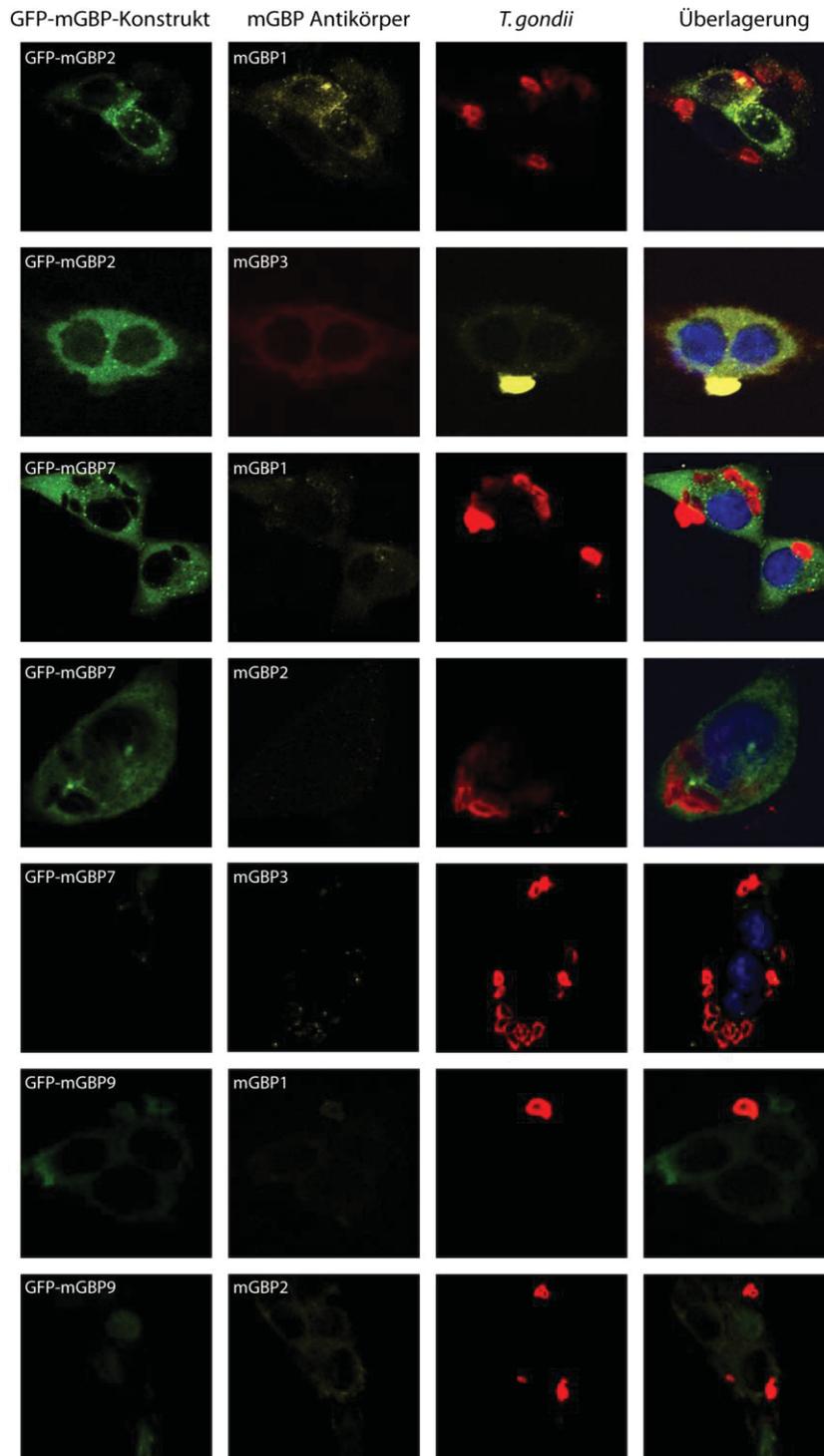


Abbildung 6 mGBP-Kolokalisationsstudien ohne IFN- $\gamma$  Stimulation mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, 63-fache Vergrößerung

Es zeigt sich die subzelluläre Lokalisation von unterschiedlichen GFP-mGBPs in NIH-3T3 Zellen ohne IFN- $\gamma$  Stimulation. In grün zeigt sich das GFP-mGBP-Protein, die Kofärbung mit einem mGBP-spezifischen-Cy3-gekoppeltem Antikörper wird in gelb dargestellt. Die Färbung der Toxoplasmen wurde mittels SAG-1 spezifischem Antikörper mit Detektion durch einen  $\alpha$ -Maus-Alexa 633 Antikörper in rot dargestellt. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse von 3 Experimenten.

Die unter Abbildung 6 aufgeführten Färbungen zeigen, dass ohne IFN- $\gamma$ -Stimulation mGBP1, mGBP2, (mGBP3), mGBP7 und mGBP9 nicht mit der PV eines intrazellulären *T.gondii* kolokalisieren.

Die unter Abbildung 5 und Abbildung 6 aufgeführten Kontrollen zeigen, dass die primären und sekundären Antikörper spezifisch waren. Es zeigt sich auch, dass die mGBPs genauso lokalisieren, wie von Degrandi et al. 2007 beschrieben und dies ebenfalls nur bei IFN- $\gamma$  Stimulation.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit die Kolokalisation verschiedener mGBPs an der *T.gondii* PV ermittelt. Hierfür wurde dann eine Auszählung der an den PVs angelagerten mGBPs durchgeführt (Tabelle 9).

<b>mGBP</b>	<b>PVs (ausge zählt)</b>	<b>GFP- markiertes und AK- gefärbtes mGBP an PV</b>	<b>Ausschließlich GFP- markiertes mGBP an PV</b>	<b>Ausschließlich AK-gefärbtes mGBP an PV</b>	<b>Unmar- kierte PVs</b>
GFP- mGBP2- +mGBP1 AK	161	83 (51,6%)	1 (0,6%)	11 (6,8%)	66 (41%)
GFP- mGBP7 +mGBP1 AK	176	66 (37,5%)	0	40 (22,7%)	70 (39,8%)
GFP- mGBP7- +mGBP2 AK	203	49 (24,1%)	9 (4,4%)	34 (16,7%)	111 (54,7%)
GFP- mGBP9 +mGBP1 AK	126	28 (22,2%)	3 (2,4%)	23 (18,3%)	72 (57,1%)
GFP- mGBP9 +mGBP2 AK	37	7 (18,9 %)	0	6 (16,2%)	24 (64,9%)

Tabelle 9 mGBP-Kofärbungen, Auszählung der mGBP positiven PVs nach IFN- $\gamma$  Stimulation. Konfokale Mikroskopie 24 h nach Infektion.

Die Tabelle 9 zeigt, in welcher Weise die GFP-markierten mGBPs und die durch AK-markierten mGBPs in einer Färbung zusammen dargestellt wurden.

Die erste Spalte gibt an, wie viele PVs insgesamt gezählt wurden; das heißt, wieviele Toxoplasmen sich intrazellulär befanden und von mGBPs umgeben waren. Die zweite Spalte zeigt, an wievielen PVs beide mGBPs angelagert waren. An diesen spezifischen PVs lagerten sich sowohl GFP-markiertes als auch vom Antikörper gefärbtes mGBP an. In der dritten Spalte wurden die PVs gezählt, an denen sich ausschließlich das GFP-markierte mGBP der jeweiligen Reihe angelagert hatte. Somit konnte dort das mittels Antikörper angefarbte mGBP nicht detektiert werden. In der vorletzten Spalte sind alle PVs aufgezählt, an denen das mittels Antikörper angefarbte mGBP detektiert wurde. Diese PVs hatten nicht das jeweilige GFP-mGBP-Konstrukt angelagert. In der letzten Spalte sind die Zahlen der unmarkierten PVs dargestellt.

Der Vergleich von GFP-mGBP2 mit mGBP1 zeigt, dass beide alleine relativ geringe Rekrutierungsraten zeigen (mGBP2 0,6% und mGBP1 6,8%), aber zusammen an 51,6% der PVs zu finden sind.

Die Untersuchung der GFP-mGBP7-Zellen in Kombination mit mGBP1 zeigt, dass mGBP7 im Vergleich zu mGBP1 (22,7%) an keiner PV alleine zu finden war. Zusammen lokalisieren mGBP7 und mGBP1 an 37,5% der PVs, doppelt so viel wie mGBP1 alleine.

GFP-mGBP7 in Kombination mit mGBP2 stellt sich vergleichbar dar. Hier ist mGBP7 nur schwach an einzelnen PVs vertreten (4,4%). An 16,7% der PVs liegen nur mGBP2-Moleküle. Beide mGBPs zusammen konnten lediglich an 24,1% der PVs detektiert werden.

Bei der Kombination von GFP-mGBP9 mit mGBP1 lokalisieren in 22,2% der Fälle beide mGBPs an der gleichen PV, nur in 2,4% der Fälle ist ausschließlich mGBP9 an der PV und bei 18,3% der Fälle mGBP1 alleine an der PV zu finden.

In Kombination von GFP-mGBP9 mit mGBP2 zeigte sich, dass beide (in 18,9% der Fälle) oder nur mGBP2 (in 16,2% der Fälle) mit der PV kolokalisieren. Es konnte keine PV gefunden werden, an der nur mGBP9 zu finden ist. Es zeigt sich also, dass mGBP1 und mGBP2 im Vergleich mit mGBP9 eine wesentlich höhere Prävalenz zur PV haben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mGBP1 und mGBP2 in den meisten Fällen kolokalisieren während die anderen mGBPs eine geringere Prävalenz zur PV zeigen.

Möglicherweise ist die Antikörperfärbung nicht so sensitiv wie die Detektion mittels GFP-Fusionsprotein, oder das Fusionsprotein ist höher exprimiert als das endogene Protein.

Um dies zu überprüfen, wurden GFP-mGBP1- exprimierende Zellen in Kombination mit dem mGBP1-Antikörper sowie GFP-mGBP2-Zellen in Kombination mit mGBP2-Antikörper gefärbt. Es sollte herausgefunden werden, ob wirklich beide Komponenten die gleichen Strukturen im zellulären Gefüge färben. Dieser Versuch war im Bezug auf die GFP-mGBP2-Zellen erfolgreich. In der unten stehenden Abbildung 7 zeigt sich ganz deutlich, dass sowohl durch das GFP-mGBP2-Konstrukt als auch durch den mGBP2-Antikörper dieselben Strukturen angefärbt werden konnten.

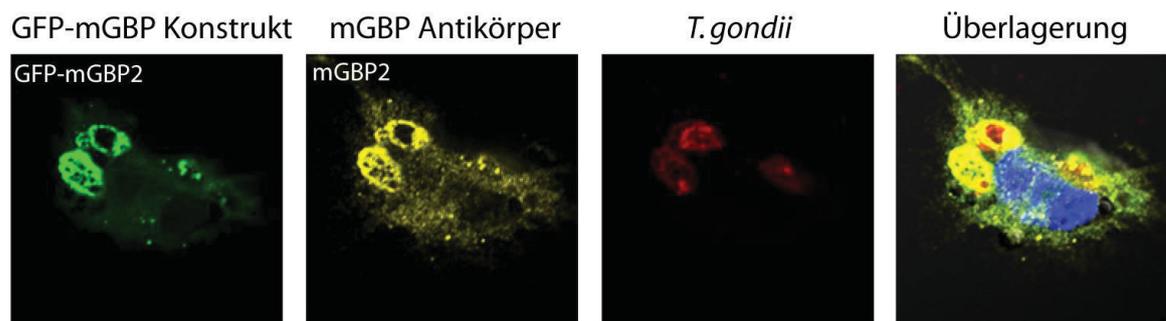


Abbildung 7 Prüfung der Kolo-kalisation von GFP-mGBP2 und mGBP2-Antikörper, 63-fache Vergrößerung

Es zeigt sich die subzelluläre Lokalisation des GFP-mGBP2-Proteins in NIH-3T3 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation (16 h). In grün zeigt sich das GFP-mGBP2-Protein, die Kofärbung mit einem mGBP2-spezifischen-Cy3-gekoppeltem Antikörper wird in gelb dargestellt. Die Färbung der Toxoplasmen nach 2 h Inkubationszeit wurde mittels SAG-1 spezifischem Antikörper mit Detektion durch einen  $\alpha$ -Maus-Alexa 633 Antikörper in rot dargestellt. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Abbildung 7 zeigt die subzelluläre Lokalisation von GFP-mGBP2 in NIH-3T3 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation (16 h). Es stellt sich heraus, dass der Antikörper die gleiche Fluoreszenzverteilung wie das GFP-Fusionsprotein zeigt. Für GFP-mGBP1-Zellen war kein Nachweis zu erbringen, da die eingesetzten GFP-mGBP1-Zellen keine detektierbare Fluoreszenz mit der PV zeigten.

### 3.2. Untersuchung der antiviralen Funktion von mGBP2

Nach Untersuchungen der Rolle von mGBP2 in der bakteriellen und parasitären Erregerabwehr (Degrandi et al., 2007) sollte im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden werden, ob mGBP2 auch eine antivirale Wirkung besitzen könnte. Es wurde bereits früher gezeigt, dass IFN- $\gamma$  wichtig für den Schutz gegen eine CMV Infektion ist (Trilling

et al., 2011; Zimmermann et al., 2005). Daher wurde die CMV-Replikation in mGBP2<sup>+/+</sup> versus mGBP2<sup>-/-</sup> murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) analysiert.

mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs und mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit IFN- $\gamma$  stimuliert und über Nacht inkubiert. Nach 20 h wurden sie mit MCMV ( $\Delta$ m157-MCMV:luciferase, siehe Trilling et al., 2011) infiziert. Dieser Stamm ist genetisch modifiziert. Anstelle des m157 Genes exprimiert das Virus ein Luciferase-Gen, welches die Möglichkeit eröffnet, mithilfe von Luciferin die virale Replikationsrate in den jeweiligen Zellen zu bestimmen (Trilling et al., 2011).

Es wurde dem Zelllysat der infizierten Zellen ein Substrat mit Luciferase-Aktivität hinzugegeben und die CMV-Replikation gemessen. Je mehr arbitrary-light-units (ALU) sich darstellten, desto mehr CMV hatte sich in den Zellen repliziert.

Die Konzentration wurde dabei entweder mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,05 oder von 5 gewählt.

Die Versuchsreihe wurde als Kinetik angelegt. An den jeweiligen Tagen (1,2,3,4,6,8 post infectionem (p.i.)) wurden Kulturen der infizierten Zellen mit je 100  $\mu$ l Luciferasepuffer eingefroren, sodass sie beim späteren Auftauen alle zusammen beim Luciferase-Assay unter Zugabe von Luciferin gemessen werden konnten.

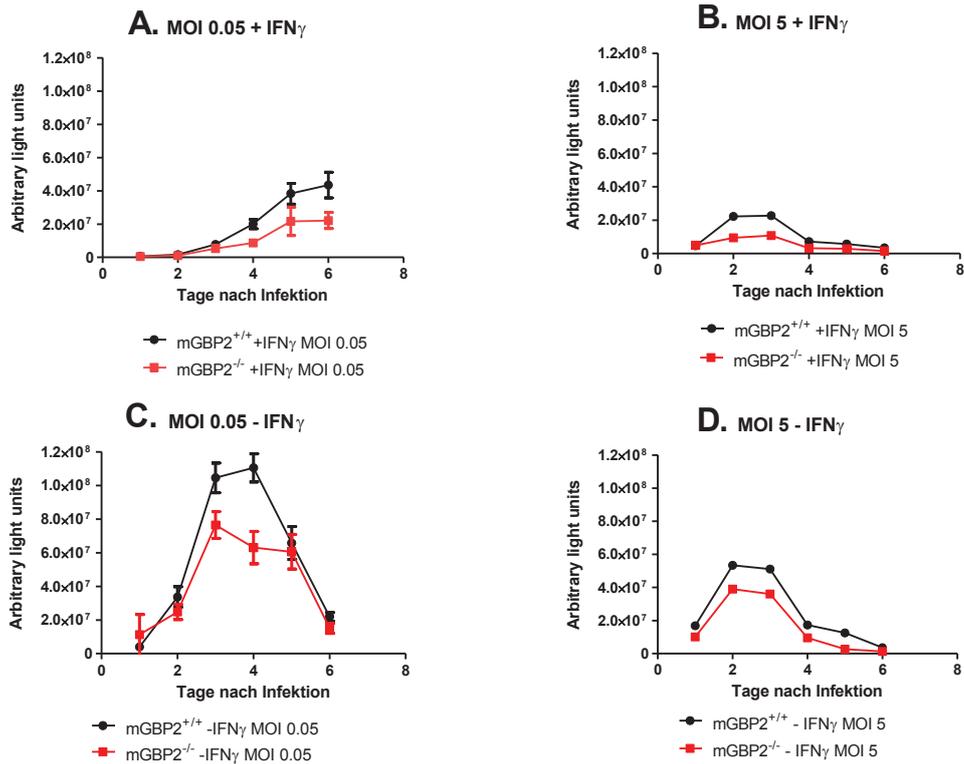


Abbildung 8  $\Delta$ m157-MCMV:luciferase Infektion von mGBP2<sup>+/+</sup> Zellen und mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen 20 h nach Vorstimulation mit IFN- $\gamma$  Ü/N.

Die Abbildung 8 zeigt die Zunahme der CMV-Replikation in Abhängigkeit von der Zeit. Auf der X-Achse sind die Tage nach der Infektion und auf der Y-Achse die Lichtintensität in Arbitrary light units (ALU) der gemessenen Proben dargestellt. Die Balken geben jeweils die Standardabweichung der verschiedenen Proben von den Mittelwerten an.

Diagramm A (Abbildung 8) zeigt die Ergebnisse der Versuche mit MEFs welche mit einer MOI von 0,05 infiziert und mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurden. Man stellt fest, dass die Virusreplikation am Anfang (Tag 1-3 p. i.) mäßig ( $1 \times 10^7$  ALU) ansteigt, mit der Zeit (Tag 4-6) aber deutlich ein exponentielles Wachstum zu beobachten ist (bis zu  $4 \times 10^7$  ALU). Die Replikation in den mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs liegt dabei stetig unter der Replikation in den mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs.

Diagramm B (Abbildung 8) zeigt die Ergebnisse der Versuche welche mit einer MOI von 5 infiziert und mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurden. Es zeigt sich, dass schon zwischen Tag 1 und 2 die Zahl der infizierten Zellen bei den mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs auf über  $2 \times 10^7$  ALU und bei den mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs auf  $1 \times 10^7$  ALU ansteigt. Die Replikation steigt nur bei den mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs noch minimal auf bis zu  $1,25 \times 10^7$  an Tag 3 p.i. an. Ab Tag drei beginnt

ein starker Abfall der Replikation. Die Endwerte sind beide am Tag 6 unter  $1 \times 10^7$  ALU. Die Replikation für die  $mGBP2^{-/-}$  MEFs liegt auch hierbei während der gesamten Versuchsdauer stetig weit unter den Werten der  $mGBP2^{+/+}$  MEFs. Es zeigt sich auch, dass eine MOI von 5 nur bis zum Tag 3 aussagekräftig ist. Wahrscheinlich sind ab Tag 3 alle MEFs bereits abgestorben aufgrund der hohen Viruslast.

Diagramm C (Abbildung 8) zeigt die Ergebnisse der Versuche welche mit einer MOI von 0,05 infiziert wurden und nicht mit  $IFN-\gamma$  stimuliert wurden. Man stellt fest, dass die Replikation bei beiden Zelltypen am Anfang (Tag 1-2 p. i.) mäßig (auf bis zu  $3 \times 10^7$  ALU) ansteigen. Besonders an Tag 3 und 4 zeigt sich ein deutlicher Anstieg (auf über  $1 \times 10^8$  ALU). Danach kann ein Abfall der Replikation bis Tag 6 (auf  $2 \times 10^7$  ALU) festgestellt werden. Ebenfalls in diesem Versuch zeigt sich, dass die Replikation von CMV in den  $mGBP2^{-/-}$  MEFs dabei stetig unter der in den  $mGBP2^{+/+}$  MEFs liegt.

Diagramm D (Abbildung 8) zeigt die Ergebnisse der Versuche welche mit einer MOI von 5 infiziert und nicht mit  $IFN-\gamma$  stimuliert wurden. Es zeigt sich, dass zwischen Tag 1 und 2 die Zahl der infizierten Zellen bei den  $mGBP2^{+/+}$  MEFs auf über  $5 \times 10^7$  ALU und bei den  $mGBP2^{-/-}$  MEFs auf  $4 \times 10^7$  ALU ansteigt. Ab Tag 3 beginnt die Replikation wieder stark zu fallen (auf einen Wert von  $<10$  ALU am Tag 6). Auch bei diesem Versuch zeigt sich, dass die Replikation der CMV-Viren in den  $mGBP2^{+/+}$  MEFs stetig über der Replikation in den  $mGBP2^{-/-}$  MEFs liegt.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass bei einer Infektion mit CMV und einer Stimulation mit  $IFN-\gamma$  die Zellen, welche  $mGBP2$  exprimieren, überraschenderweise eine höhere CMV-Last haben als Zellen, die kein  $mGBP2$  exprimieren. Dies zeigt sich auch bei einer Infektion mit CMV ohne eine Stimulation mit  $IFN-\gamma$ . Die  $mGBP2^{+/+}$  MEFs haben immer noch eine deutlich höhere CMV-Last als die  $mGBP2^{-/-}$  MEFs. Dabei ist aber zu bemerken, dass ohne  $IFN-\gamma$ -Stimulation die absoluten Werte insgesamt sowohl für  $mGBP2^{+/+}$  MEFs als auch für die  $mGBP2^{-/-}$  MEFs deutlich höher liegen als bei dem Versuch mit  $IFN-\gamma$ -Stimulation. Es werden also, wie erwartet, mehr Viren repliziert wenn keine  $IFN-\gamma$  Stimulation vorausgegangen ist.

Eine Infektion mit einer MOI von 5 ist zu hoch, um aussagekräftige Informationen nach Tag 3 zu liefern.

Da das Ergebnis zunächst unerwartet war, wurden weitere unabhängige Versuche zur Virusreplikation von MCMV durchgeführt. Eins von zwei weiteren Experimenten ist in Abbildung 9 dargestellt.

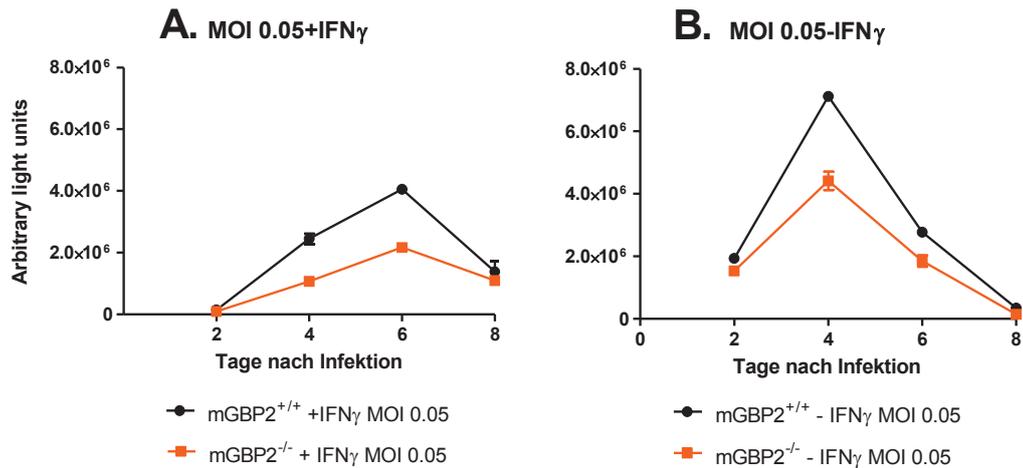


Abbildung 9  $\Delta$ m157-MCMV:luciferase Infektion von mGBP2<sup>+/+</sup> Zellen und mGBP2<sup>-/-</sup> Zellen 20 h nach Vorstimulation mit IFN- $\gamma$  Ü/N.

Die hier vorliegenden Ergebnisse in Abbildung 9 zeigen die Wiederholung der oben unter Abbildung 8 dargestellten Versuche mit verlängerter Kinetik. Dabei interessierte uns besonders, was bei einer MOI von 0,05 nach dem sechsten Tag passieren würde. Es war bei den vorherigen Versuchen, welche nur bis Tag 6 liefen, kein Höhepunkt der MCMV-Replikation in den IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen ersichtlich. Das Folgeexperiment sollte untersuchen, wie die Replikation nach Tag sechs aussieht. Nach Tag sechs fielen die Werte der ALU ab. So zeigte sich, dass hier ebenfalls eine Überlastung der Zellen mit dem Virus und eine daraus resultierende Apoptose der Zellen eintrat oder das Virus erfolgreich inhibiert wurde. Der Versuch stellte sich, außer in kleinen quantitativen Unterschieden im Verhältnis von mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs zu mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs, gleich dar wie die ersten Versuche.

CMV besitzt Mechanismen die IFN-induzierte Immunantwort zu stören (Trilling et al., 2011). Die Notwendigkeit der IFN- $\gamma$  Stimulation für die Induktion von mGBP2 (Degrandi et al., 2007) zeigt sich beim durchgeführten Western-Blot der Zelllysate. Nach IFN- $\gamma$  Stimulation exprimieren die Zellen mGBP2. Es wird deutlich, dass keine großen Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen bestehen. Infizierte Zellen und nicht infizierte Zellen exprimieren beide mGBP2 nach IFN- $\gamma$  Stimulation (siehe Abbildung 10).

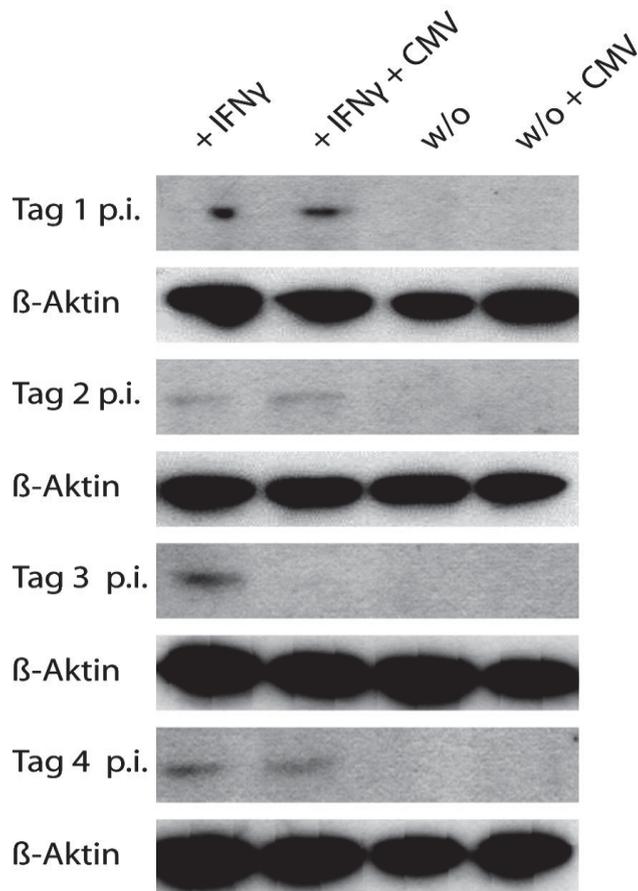


Abbildung 10 Lysate der CMV infizierten mGBP2 Zellen wurden auf mGBP2 Expression im Western Blot analysiert (w/o = ohne IFN- $\gamma$  Stimulation)

Abbildung 10 zeigt den Western-Blot von Lysaten aus CMV infizierten mGBP2-Zellen der Experimente aus Abbildung 9 an den Tagen 1-4 p.i.. Für die Färbung wurden das  $\alpha$ -mGBP2 Serum und der sekundäre  $\alpha$ -Rabbit POX Antikörper verwendet (siehe 2.1.2). Zusätzlich zeigt die Abbildung die  $\beta$ -Aktin-Kontrolle zum Nachweis, dass alle Spuren des Blots mit gleichen Mengen an Protein geladen waren.

Die Western-Blots zeigen, dass mGBP2-Protein auch in den CMV infizierten Zellen vorhanden ist. Es kann gefolgert werden, dass eine CMV-Infektion somit keinen Einfluss auf die Stabilität von mGBP2 hat, wenn die Zellen mit IFN- $\gamma$  vorstimuliert waren.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse aus dem CMV-Experiment die Erwartungen, dass mGBP2 bei der Kontrolle der CMV-Replikation eine Rolle spielt, zumindest mit  $\Delta$ m157 defizientem Virus, nicht bestätigen. Insgesamt konnte kein antiviraler Effekt von mGBP2 gefunden werden. Die Ergebnisse der Versuche mit einer MOI von 0,05 zeigen, dass in den mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs keine höhere, sondern eher eine niedrigere CMV-Replikations-Rate als in den mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs vorliegt. Die Ergebnisse

des Western-Blot zeigen, dass die Stimulation mit IFN- $\gamma$  für das Vorhandensein von mGBP2 notwendig ist, unabhängig davon, ob die Zellen mit CMV infiziert waren oder nicht. Die Reaktion der Viren auf vorhandenes mGBP2 lässt doch eher einen proviralen Effekt vermuten, der in der Zukunft noch mechanistisch untersucht werden sollte.

## 4. Diskussion

### 4.1. Interaktion verschiedener mGBPs in der parasitären Abwehr: Lokalisation der mGBPs in Bezug auf die intrazelluläre Lage von *T. gondii*

Degrandi et. al. haben schon 2007 gezeigt, dass verschiedene mGBPs zur PV von *T. gondii* rekrutiert werden. Es zeigte sich, dass mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP7 und mGBP9 besonders effizient an der parasitophoren Vakuole (PV) von *T. gondii* lokalisieren. Dabei wurden circa 50% der intrazellulären PVs von mGBPs markiert. Als Weiterentwicklung dieser Beobachtungen sollte nun untersucht werden, ob es unter den einzelnen mGBPs eine Art Konkurrenz- oder Synergieeffekt an der PV gibt. Es wäre interessant zu wissen, ob die mGBPs an einzelnen PVs unterschiedlich häufig kolokalisieren.

Um die Wirkung der mGBPs an der PV zu untersuchen, ist es wichtig auch den Stimulus für eine mGBP-Expression genauer zu betrachten.

IFN- $\gamma$  ist essentiell für die Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene wie zum Beispiel *T. gondii*. Es zeigt sich, dass die Stimulation von angeborenen Immunzellen mit IFN- $\gamma$  mehr als 2000 Effektorgene hochreguliert (Boehm et al., 1997), wie zum Beispiel die p65 Guanylat-bindende Proteine, die mGBPs (Yamamoto et al., 2012). Yamamoto et al. haben eine Knockout Maus für alle sechs auf dem Chromosom 3 befindlichen mGBPs generiert. Mäuse, welchen diese sechs auf dem Chromosom 3 liegenden GBPs fehlen, zeigten eine deutlich höhere *T. gondii* Infektionsrate und eine stärkere Vermehrung der Parasiten in lymphatischen Geweben (Yamamoto et al., 2012).

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Yamamoto zeigen, dass das GBP-Chromosom 3 durch das Kontrollieren der IFN- $\gamma$  herbeigeführten Irgb6-abhängigen zellulären angeborenen Immunabwehr eine zentrale Rolle in der Wirtsabwehr gegen *T. gondii* spielt.

Um die Effektorfunktion von mGBPs in der Abwehr gegen *T. gondii* zu untersuchen, wurden in der Vergangenheit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf Knockout-Mäuse von einzelnen mGBPs generiert (Degrandi et al, 2013 und unpublizierte Daten). Die mGBP2

defizienten Mäuse sind durch erhöhte Morbidität und Mortalität in der *T.gondii* Infektion gekennzeichnet und weisen größere Zystenzahlen im Gehirn auf (Degrandi et al., 2013). Zusammengenommen lassen die Ergebnisse von Degrandi et al. und Yamamoto auf einen synergistischen Effekt der mGBPs bei der Abwehr von *T.gondii* schließen.

Eine Rolle in der Abwehr gegen *T.gondii* wurde auch für die Mitglieder der p47 GTPasen Familie, weiteren Mitgliedern der Dynamin-Superfamilie, erforscht. Auch hierbei führte die Infektion mit dem Typ II ME49 Toxoplasmenstamm in *Irgm1* und *Irgm3* defizienten Mäusen zu erhöhter Letalität der Mäuse (Taylor, 2007; Taylor et al., 2004).

Für 65 kDa GTPasen wurde bisher gezeigt, dass mGBP1, mGBP2, mGBP3, mGBP6, mGBP7 und mGBP9 an der PV kolokalisieren (Degrandi et al., 2007). In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass mehrere mGBPs gleichzeitig an einer PV kolokalisieren können. Ob ein Synergismus oder eine Konkurrenz zwischen den mGBPs existiert, lässt sich durch die bisher durchgeführten Arbeiten allerdings noch nicht eindeutig herausstellen.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass es synergistische Effekte zwischen den mGBPs gibt. Man kann aber auch vermuten, dass die mGBPs eine redundante oder komplementäre Funktion haben. Zur Klärung dieser Fragestellung müssten weitere Knockout-Linien mit Inaktivierungen der einzelnen mGBPs etabliert und in der *T.gondii* Infektion untersucht werden.

Als eine Einschränkung im Laufe der experimentellen Arbeiten dieser Promotion stellte sich dar, dass es an ausreichend spezifischen Antikörpern und möglichen Kombinationen der GFP-mGBP Konstrukte für Kontrollfärbungen fehlte. Es lässt sich aufgrund der verfügbaren Zelllinien und Antikörper nur eine eingeschränkte Aussage darüber treffen, woher die unterschiedlichen Rekrutierungsverhalten der mGBPs zur PV resultieren.

Zusammenfassend zum ersten Teil der Dissertation lässt sich sagen, dass die durch den Antikörper gefärbten mGBP1- und mGBP2-Proteine häufiger mit der PV eines *T.gondii* kolokalisieren als GFP-mGBP7 und GFP-mGBP9. Diese Ergebnisse erlauben eine erste interessante Aussage in der Untersuchung synergistischer Effekte der GBPs in der zellulären Abwehr gegen *T.gondii*. Da die Unterschiede in der Rekrutierungshäufigkeit zur PV teilweise recht gering waren und es nur einzelne GFP-mGBP-Konstrukte und entsprechende Antikörper gab (um weitere Färbungen anderer

mGBP-Kombinationen und Kontrollen durchzuführen), sollten weitere Versuchsreihen erfolgen.

Hierfür wäre es gut, wenn man zum Beispiel GFP-mGBP3, GFP-mGBP4, GFP-mGBP5, GFP-mGBP6, GFP-mGBP8 stabil exprimierende Zellen herstellen könnte oder es spezifische Antikörperfärbungen für mGBP3, mGBP4, mGBP5, mGBP6, mGBP7, mGBP8, mGBP9 gäbe. Man könnte dann in vielfältigen Kombinationen Färbungen anfertigen und verbesserte Kontrollen durchführen. Es ließe sich so herausfinden, ob die endogenen Proteine besser mit der PV kolokalisieren als das GFP-mGBP-Konstrukt oder ob bestimmte mGBPs eine höhere Prävalenz als andere mGBPs zur PV haben.

Die molekulare Funktion der GTPasen ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Die detaillierte Funktion von mGBP2 in der Immunabwehr gegen *T.gondii* wurde allerdings kürzlich eingehender analysiert (Degrandi et al., 2013). Die mGBP2 Expression wurde in verschiedenen Zelltypen untersucht. Es wurde auch die subzelluläre Verteilung von mGBP2 sowie die C-terminale-, die Mittel- und die N-terminale Domäne in Bezug auf die korrekte Lage und Verteilung in *T.gondii* infizierten Zellen betrachtet. Die Ergebnisse zeigen eine Kolokalisation zwischen mGBP2 und der PV des Parasiten *T.gondii*, was diesen, möglicherweise über eine direkte Interaktion, an seiner Replikation hindert und somit dessen Verbreitung unterbindet (Degrandi et al., 2013). Es zeigt sich in den Versuchen von Degrandi et al., dass die C-terminale Domäne von mGBP2 essentiell ist für die Rekrutierung von mGBP2 zur PV von *T.gondii*. Die proliferationsinhibitorische Funktion von mGBP2 auf *T.gondii* manifestiert sich in Defekten in der Replikationskontrolle in mGBP2-defizienten Zellen (Degrandi et al., 2013).

Allerdings bleibt noch die Frage offen, ob mGBP2 nur selber an der PV wirkt, oder ob es dort auch die Aktivität von anderen Proteinen (aus der GBP-, der IRG- oder anderen Proteinfamilien) beeinflussen kann.

## **4.2. Auswirkung von mGBP2 auf eine virale Infektion am Beispiel der Zytomegalie-Infektion**

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen von Degrandi et al. (Degrandi et al., 2007) wurde vermutet, dass mGBP2 nicht nur eine antiparasitäre sondern auch eine antivirale Wirkung besitzt.

Carlow et al. untersuchten schon im Jahre 1998 spezifische antivirale Aktivitäten von TGTP, einem Mitglied der IFN-induzierten-47kDa-GTPasen Familie. Dabei wurde bei einer neuen Familie von GTPasen, wie zum Beispiel IRG-47, LRG-47, IGTP und TGTP/Mg21 eine signifikante Sequenz-Übereinstimmung von 25-40% nachgewiesen (Carlow et al., 1998), deren Expression durch IFN- $\gamma$ , - $\alpha$  und - $\beta$  oder auch durch bakterielle Lipopolisaccharide induziert wird (Carlow et al., 1998). Für TGTP wurde eine intrinsische GTPase-Aktivität nachgewiesen und es wurde vermutet, dass TGTP in der Immunabwehr gegen virale Infektionen wirkt (Carlow et al., 1998). Dies wurde bestätigt, als TGTP-transfizierte T-Zellen eine relative Resistenz bei der Plaque-Formation von Vesicular Stomatitis Virus (VSV), aber nicht bei Herpes Simplex Virus (HSV) zeigten. Diese Ergebnisse platzierten TGTP in die kleine Familie der angeborenen antiviralen Effektormoleküle (Carlow et al., 1998). Da auch mGBP2 eine GTPase ist, wurde vermutet, dass auch mGBP2 eine antivirale Potenz besitzt.

Tatsächlich wurde für hGBP1 (Anderson et al., 1999) und mGBP2 (Carter et al., 2005) eine schwache antivirale Aktivität in HeLa Zellen und NIH 3T3-Fibroblasten nach einer Infektion mit VSV oder Encephalomyokarditis Virus nachgewiesen. Dabei wurde die Inhibition des viralen Wachstums durch mGBP2 GTP-bindungsabhängig beim Encephalomyokarditisvirus dargestellt und GTPase unabhängig bei VSV gebunden. (Anderson et al., 1999; Carter et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass es unterschiedliche Effektor-Mechanismen des mGBP2-Proteins abhängig von dem Virustypen gibt (Degrandi et al., 2007).

Die Forschergruppe um Balasubramanian hat sich weiterhin mit der Wirkung von IFN- $\gamma$  stimuliertem mGBP2 auf Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und die Induktion von Matrix-Metallo-Proteinase-9 (MMP9) beschäftigt (Balasubramanian et al., 2011). Beide, IFN- $\gamma$  und mGBP2, inhibieren die Transkription eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporter-Konstrukts, was nahe legt, dass mGBP2 die MMP9-Induktion durch die Inhibition von NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription inhibiert (Balasubramanian et al., 2011). Es stellt sich heraus, dass mGBP2 die Bindung von p65 zu einer  $\kappa$ B Oligonukleotide Probe im Gel-Shift-Assay inhibiert (Balasubramanian et al., 2011). In der Literatur ist zu finden, dass zum Beispiel hGBP1, die Hepatitis C Virus (HCV) Replikation inhibiert (Itsui et al., 2009). Dabei zeigt sich, dass die HCV-Replikation durch die Überexpression von hGBP1 supprimiert wird und dass ein Expressionsblock von hGBP1 wiederum die HCV-RNA-Replikation signifikant erhöhte. Dabei ließ sich aber auch nachweisen, dass das Binden des HCV-NS5B Proteins an hGBP1 durch die Inhibition der GTPase-Aktivität dessen antiviralem Effekt entgegenwirkte (Itsui et al., 2009).

Die oben dargestellten Ergebnisse anderer Forschergruppen zeigen eine ähnliche Tendenz wie unsere Ergebnisse. Auch wir hatten vermutet, einen antiviralen Effekt von mGBP2 zu finden und wurden überrascht, dass dieser zumindest in der Zellkultur noch nicht nachweisbar war.

Die für unsere Versuche eingesetzten GTPasen (wie zum Beispiel mGBP2) zeigen eine deutliche antiparasitäre Aktivität, wenn sie zuvor mit IFN- $\gamma$  induziert wurden. Wie unter Kapitel 1.2 beschrieben, wirkt IFN- $\gamma$  in der Immunabwehr als antivirale Komponente. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass, überraschenderweise, mit IFN- $\gamma$  vorstimuliertes mGBP2 Protein während einer MCMV Infektion keinen antiviralen Effekt ausüben kann.

Es ist interessant, dass auch andere Arbeitsgruppen ähnliche unerwartete Effekte bei primär anti-inflammatorischen Proteinen festgestellt haben. Die Arbeitsgruppe um Ku et al. konnte 2011 ähnliche Beobachtungen machen. Es zeigte sich bei IFN-Typ I-Stimulation ein Anstieg der Virusmenge bei bestimmten Virusinfektionen. Dabei wurde besonders MxA untersucht. MxA ist ein antivirales Protein, welches durch IFN- $\alpha/\beta$  stimuliert die Replikation von vielen Viren inhibiert. Durch IFN- $\alpha$  stimuliert, zeigte das 76 kDa MxA Protein eine antivirale Aktivität gegen HSV 1, einem DNA Virus. Die 56 kDa MxA Isoform, kurz varMxA, jedoch zeigte eine Assoziation mit HSV-1 Regulator-Proteinen, welche die Infektion förderten (Ku et al., 2011). Das VarMxA-Protein wurde in den Zellkern der infizierten Zellen transloziert, wo es mit viralen-Replikations-Kompartimenten und den Virionen assoziierte. Anstatt die Infektion zu inhibieren, förderte die Expression von varMxA die Produktion von infektiösen Viren in HSV-1-infizierten Zellen (Ku et al., 2011). Dieser Versuch zeigt, dass das alternative Splicing der zellulären mRNA in die Expression einer neuen Isoform münden kann, welche dann nicht mehr die virale Infektion unterdrückt, sondern fördert (Ku et al., 2011). Ein vergleichbarer Mechanismus könnte auch bei meinen Experimenten zugrunde liegen. Möglicherweise existiert auch eine mGBP2 Isoform, welche die CMV Replikation unter IFN- $\gamma$  Stimulation fördert.

Auch die Arbeitsgruppe um Schoggins zeigte unerwartete Effekte bei IFN-stimulierten Genen (ISGs) (Schoggins et al., 2011). Einige ISGs wie zum Beispiel ADAR, FAM46C, LY6E und MCOLN2 steigerten bei bestimmten Viren die Replikation anstatt sie zu unterbinden. Dies zeigt erneut eine weitere Steigerung der Komplexität des IFN Systems (Schoggins et al., 2011).

Trilling und Konermann hatten eine CMV-Infektion bereits früher an NIH 3T3 GFP-mGBP2 Zellen durchgeführt (unpubliziert). Es wurden GFP-mGBP2-MEFs mit IFN- $\gamma$  stimuliert und mit CMV infiziert. Nach 4, 24, 48 h p. i. wurde gemessen ob mGBP2

endogen oder exogen exprimiert wurde. Es zeigte sich, dass MCMV für unspezifische Banden im Western-Blot sorgte. Es stellte sich die Frage, ob mGBP2 von MCMV in seiner räumlichen Konfiguration verändert oder sogar komplett degradiert wird. Dies konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MCMV in mGBP2<sup>+/+</sup> MEFs eine höhere Replikationsrate hat als in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs. Die Versuche zeigten, dass sobald eine mGBP2-Aktivität in den infizierten Zellen vorliegt, die Replikationsrate von CMV gesteigert ist. Somit war keine antivirale Wirkung von mGBP2 feststellbar. Dies entspricht nicht den Erwartungen, wurde doch für mGBP2 in den meisten bisherigen Publikationen immer eine anti-mikrobielle Wirkung postuliert (Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013; Gorbacheva et al., 2002; Kravets et al., 2012).

Die vorliegenden und in der Literatur zu findenden Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass anti-mikrobielle Proteine in Reaktion mit verschiedenen Virustypen nicht gleich wirken, wie bei einer bakteriellen oder parasitären Infektion. Dies zeigt sich am Beispiel von mGBP2, welches bei einer *T.gondii* Infektion anti-mikrobiell wirkt, bei einer MCMV Infektion allerdings nicht. Bei einer *L.monocytogenes* Infektion spielt mGBP2 beispielsweise auch keine Rolle (Degrandi et al., 2013). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das mGBP2-Gen durch CMV verändert wird (s.o.). Es könnte auch sein, dass mGBP2 nicht direkt mit der Virusreplikation zusammenhängt, sondern lediglich für das Überleben der Zelle verantwortlich ist. Wenn die Zelle ohne die Anwesenheit von mGBP2 zum Beispiel schneller Defekte entwickelt, kann sich das Virus dort schlechter replizieren. Allerdings wäre es auch möglich, dass die Deletion des m157 Proteins von MCMV zu einer verminderten Replikation des Virus in mGBP2<sup>-/-</sup> MEFs führt. Um diese Frage zu untersuchen, müsste man Versuche mit einem Wildtyp MCMV Virus durchführen.

Zusammenfassend zum zweiten Teil dieser Arbeit lässt sich sagen, dass eine MCMV Infektion keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität der mGBP2-Proteine hat, allerdings das mGBP2-Protein einen Einfluss auf die CMV-Replikationsrate *in vitro* nimmt. Es sollten weitere CMV-Experimente durchgeführt werden (insbesondere *in vivo* Infektionen in mGBP2-defizienten Mäusen), um herauszufinden, ob mGBP2 tatsächlich einen proviralen Effekt aufweisen könnte. Es wäre weiterhin spannend zu untersuchen, ob mGBP2 einen antiviralen Effekt gegen andere Virustypen als MCMV zeigt.

### 4.3. Ausblick

Es wäre erstrebenswert, dass die molekularen Abläufe der Erregerabwehr mithilfe von GBPs in der Medizin genutzt werden könnten. Die murinen aber auch die humanen GBPs könnten vielleicht in der Zukunft als therapeutischer Ansatz fungieren.

Für bisher nur schwer heilbare, chronische Krankheiten wie die Toxoplasmose oder die Zytomegalie sollten Therapiekonzepte untersucht werden, welche dazu führen, dass man durch gezielte Modulation der GBPs die Schwere von Zytomegalie und Toxoplasmose Erkrankungen verringern könnte. Es ist vorstellbar, dass durch das Verstehen der zellulären und molekularen Strukturen eine Möglichkeit besteht, die Überlebenschance der Pathogene zu verringern oder die Immunantwort des Organismus so zu stimulieren, dass die Krankheit präventiv behandelt werden kann.

Sowohl die Infektion mit *T.gondii* als auch die Infektion mit CMV hat embryonale Schädigungen zur Folge, wenn die Erstinfektion während der Schwangerschaft der Mutter auftritt. Der Schutz des ungeborenen Lebens durch adäquate Behandlung der Mütter könnte vielleicht in ferner Zukunft mit einer Therapie im Sinne einer GBP-Stimulation möglich sein. Man kann hoffen, dass damit die, wegen den Nebenwirkungen komplizierte Antibiotika- oder Virostatikatherapie von schwangeren Patientinnen, reduziert und möglicherweise ersetzt werden kann.

Auch ist die fortführende Erforschung von mGBP2 in der Tumorentwicklung und Tumorigenese siehe (Balasubramanian et al., 2011) wünschenswert.

## 5. Literaturverzeichnis

- Anderson, S.L., Carton, J.M., Lou, J., Xing, L., and Rubin, B.Y. (1999). Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 256, 8-14.
- Asundi, V.K., Stahl, R.C., Showalter, L., Conner, K.J., and Carey, D.J. (1994). Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 1217, 257-265.
- Balasubramanian, S., Fan, M., Messmer-Blust, A.F., Yang, C.H., Trendel, J.A., Jeyaratnam, J.A., Pfeffer, L.M., and Vestal, D.J. (2011). The interferon-gamma-induced GTPase, mGBP-2, inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) induction of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by inhibiting NF-kappaB and Rac protein. *J Biol Chem* 286, 20054-20064.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Futterer, A., Pfeffer, K., and Howard, J.C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J Immunol* 161, 6715-6723.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Carlow, D.A., Teh, S.J., and Teh, H.S. (1998). Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J Immunol* 161, 2348-2355.
- Carter, C.C., Gorbacheva, V.Y., and Vestal, D.J. (2005). Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch Virol* 150, 1213-1220.
- Celada, A., and Schreiber, R.D. (1987). Internalization and degradation of receptor-bound interferon-gamma by murine macrophages. Demonstration of receptor recycling. *J Immunol* 139, 147-153.
- Cheng, Y.S., Becker-Manley, M.F., Chow, T.P., and Horan, D.C. (1985). Affinity purification of an interferon-induced human guanylate-binding protein and its characterization. *J Biol Chem* 260, 15834-15839.
- Cheng, Y.S., Colonna, R.J., and Yin, F.H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem* 258, 7746-7750.
- Cheng, Y.S., Patterson, C.E., and Staeheli, P. (1991). Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol Cell Biol* 11, 4717-4725.
- 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.
- de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 69, 912-920.
- Degrandi, D., Hoffmann, R., Beuter-Gunia, C., and Pfeffer, K. (2009). The proinflammatory cytokine-induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J Interferon Cytokine Res* 29, 55-67.
- Degrandi, D., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Kresse, A., Wurthner, J., Kurig, S., Beer, S., and Pfeffer, K. (2007). Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol* 179, 7729-7740.

- Degrandi, D., Kravets, E., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 294-299.
- Doerr, G. (2010). *Medizinische Virologie*. Thieme Verlag *2. Auflage*, 225,666-675.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* *11*, 267-299.
- Endres, R., Luz, A., Schulze, H., Neubauer, H., Futterer, A., Holland, S.M., Wagner, H., and Pfeffer, K. (1997). Listeriosis in p47(phox<sup>-/-</sup>) and TRp55<sup>-/-</sup> mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. *Immunity* *7*, 419-432.
- Gorbacheva, V.Y., Lindner, D., Sen, G.C., and Vestal, D.J. (2002). The interferon (IFN)-induced GTPase, mGBP-2. Role in IFN-gamma-induced murine fibroblast proliferation. *J Biol Chem* *277*, 6080-6087.
- Gupta, S.L., Rubin, B.Y., and Holmes, S.L. (1979). Interferon action: induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4817-4821.
- Ho-Yen, D.O. (1990). Toxoplasmosis in humans: discussion paper. *J R Soc Med* *83*, 571-572.
- Hof, D. (2009). *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme *4. Auflage*, 91-120,247-248,505-509.
- Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* *10*, 766-778.
- Ihle, J.N. (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* *84*, 331-334.
- Itsui, Y., Sakamoto, N., Kakinuma, S., Nakagawa, M., Sekine-Osajima, Y., Tasaka-Fujita, M., Nishimura-Sakurai, Y., Suda, G., Karakama, Y., Mishima, K., *et al.* (2009). Antiviral effects of the interferon-induced protein guanylate binding protein 1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. *Hepatology* *50*, 1727-1737.
- Konermann, C., Kresse, A., Beuter-Gunia, C., Wurthner, J., Degrandi, D., Pfeffer, K., and Beer, S. (2007). In silico and in vitro characterization of mGBP4 splice variants. *DNA Cell Biol* *26*, 847-851.
- Kravets, E., Degrandi, D., Weidtkamp-Peters, S., 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*. *J Biol Chem* *287*, 27452-27466.
- Kresse, A., Konermann, C., Degrandi, D., Beuter-Gunia, C., Wuerthner, J., Pfeffer, K., and Beer, S. (2008). Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC Genomics* *9*, 158.
- Ku, C.C., Che, X.B., Reichelt, M., Rajamani, J., Schaap-Nutt, A., Huang, K.J., Sommer, M.H., Chen, Y.S., Chen, Y.Y., and Arvin, A.M. (2011). Herpes simplex virus-1 induces expression of a novel MxA isoform that enhances viral replication. *Immunol Cell Biol* *89*, 173-182.
- Lee, C.S., Cragg, M., Glennie, M., and Johnson, P. (2013). Novel antibodies targeting immune regulatory checkpoints for cancer therapy. *Br J Clin Pharmacol*.
- MacMicking, J.D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* *12*, 367-382.

- Martens, S., and Howard, J. (2006). The interferon-inducible GTPases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 559-589.
- Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G., and Howard, J.C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuoles by the Mouse p47-Resistance GTPases. *PLoS Pathog* 1, e24.
- Mocarski ES, S.T., Pass RF, ed. (2007). *Cytomegaloviruses* (Philadelphia Lippindott, Williams & Wilkins).
- Murphy, T., Walport, ed. (2009). *Janeway Immunologie* (Spektrum Akademischer Verlag); 7.Auflage; 3-50, 121-123
- Nguyen, T.T., Hu, Y., Widney, D.P., Mar, R.A., and Smith, J.B. (2002). Murine GBP-5, a new member of the murine guanylate-binding protein family, is coordinately regulated with other GBPs in vivo and in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 22, 899-909.
- Novotna, M., Hanusova, J., Klose, J., Preiss, M., Havlicek, J., Roubalova, K., and Flegr, J. (2005). Probable neuroimmunological link between *Toxoplasma* and cytomegalovirus infections and personality changes in the human host. *BMC Infect Dis* 5, 54.
- Polic B, H.H., Krmpotic A, Trgovcich J, Pavic I, et al. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 188, 1047-1054.
- Praefcke, G.J., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133-147.
- Schindler, C., and Darnell, J.E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651.
- Schoggins, J.W., and Rice, C.M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1, 519-525.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481-485.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189.
- Schwemmle, M., Kaspers, B., Irion, A., Staeheli, P., Schultz, U. (1996). Chicken guanylate-binding protein. Conservation of GTPase activity and induction by cytokines. *J Biol Chem* 271, 10304-10308.
- Sibley, L.D. (2011). Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev* 240, 72-91.
- Staeheli P., H.O., Boll W., Lindemann J., Weissman C. (1986). Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44, 147-158.
- Taylor, G.A. (2007). IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 9, 1099-1107.
- Taylor, G.A., Feng, C.G., and Sher, A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 4, 100-109.
- 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 Pathog* 7, e1002069.

Vestal, D.J. (2005). The guanylate-binding proteins (GBPs): proinflammatory cytokine-induced members of the dynamin superfamily with unique GTPase activity. *J Interferon Cytokine Res* 25, 435-443.

Vyas, A., Kim, S.K., Giacomini, N., Boothroyd, J.C., and Sapolsky, R.M. (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6442-6447.

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.

Zimmermann, A., Trilling, M., Wagner, M., Wilborn, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U., and Hengel, H. (2005). A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- $\gamma$  signaling and antiviral responses. *J Exp Med* 201, 1543-1553.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 JAK-STAT Signalweg des IFN- $\gamma$ Rezeptors (aus Schroder et al., 2004) ....	3
Abbildung 2 Domänenstruktur der humanen Dynamin Superfamilie (aus Praefcke und McMahon, 2004) .....	6
Abbildung 3 Phylogenetischer Baum der IFN- $\gamma$ -regulierten GTPasen (aus Degrandi et al., 2007).....	7
Abbildung 4 Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> (nach Dubey et al., 1998).....	9
Abbildung 5 mGBP-Kolokalisationsstudien unter IFN- $\gamma$ Stimulation mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, 63-fache Vergrößerung. ....	31
Abbildung 6 mGBP-Kolokalisationsstudien ohne IFN- $\gamma$ Stimulation mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, 63-fache Vergrößerung .....	32
Abbildung 7 Prüfung der Kolokalisation von GFP-mGBP2 und mGBP2-Antikörper, 63-fache Vergrößerung .....	35
Abbildung 8 $\Delta$ m157-MCMV:luciferase Infektion von mGBP2 <sup>+/+</sup> Zellen und mGBP2 <sup>-/-</sup> Zellen 20 h nach Vorstimulation mit IFN- $\gamma$ Ü/N. ....	37
Abbildung 9 $\Delta$ m157-MCMV:luciferase Infektion von mGBP2 <sup>+/+</sup> Zellen und mGBP2 <sup>-/-</sup> Zellen 20 h nach Vorstimulation mit IFN- $\gamma$ Ü/N. ....	39
Abbildung 10 Lysate der CMV infizierten mGBP2 Zellen wurden auf mGBP2 Expression im Western Blot analysiert .....	40

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien.....	16
Tabelle 2 Antikörper .....	17
Tabelle 3 Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....	18
Tabelle 4 Geräte .....	19
Tabelle 5 Stammlösungen und Puffer.....	21
Tabelle 6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	21
Tabelle 7 Verwendete Erregerstämme .....	22
Tabelle 8 Verwendete Zellen.....	22
Tabelle 9 mGBP-Kofärbungen, Auszählung der mGBP positiven PVs nach IFN- $\gamma$ Stimulation. Konfokale Mikroskopie 24 h nach Infektion. ....	33

## **8. Danksagung**

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Dr. Klaus Pfeffer, welcher mir die Chance gab, diese Promotion anzufangen.

Weiterhin möchte ich Dr. Daniel Degrandi für die konstruktive und freundliche Betreuung danken.

Mein besonderer Dank gilt Verena Klümpers und Dr. Elisabeth Kravets.

Prof. Mirko Trilling danke ich für die Unterstützung in allen virologischen Fragen.

Allen Mitgliedern der AGs Pfeffer, Däubener, Scheu und Hendrich danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei allen labor- und schreibtechnischen Belangen. Jederzeit wurden vom Team alle meine Fragen beantwortet und mir Unterstützung gewährt. Ich habe mich sehr wohl gefühlt.

Meinen Liebsten und Freunden sowie meiner Familie danke ich für die Unterstützung bei alledem, das zeitgleich zur Promotion in meinem Leben geschah!

## **9. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift