

Analyse der dynamischen mGBP-Rekrutierung zu Pathogen-enthaltenden Membrankompartimenten

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Nora Steffens

aus Lüdinghausen

Düsseldorf, Januar 2020

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
(Universitätsklinikum Düsseldorf) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Klaus Pfeffer
2. Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XI
Summary.....	XIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.1.1 Das angeborene, unspezifische Immunsystem	1
1.1.2 Das spezifische, erworbene Immunsystem.....	3
1.2. Zytokine	5
Interferone	5
Interferon- γ	5
1.3. Die p65 murinen Guanylat-bindenden Proteine	8
1.3.1 Phänotypen von mGBP-defizienten Mäusen nach <i>T. gondii</i> -Infektionen.....	11
1.3.2 Das murine GBP7-Protein.....	13
1.4. Der obligate, intrazelluläre Parasit <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.4.1 Der Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	15
1.4.2 Die Wirtsinteraktion von <i>T. gondii</i> und die Ausbildung einer parasitophoren Vakuole ...	17
1.4.3 Die Aktivierung des Immunsystems während einer <i>T. gondii</i> -Infektion	19
1.5. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material.....	25
2.1. Bezugsquellennachweis	25
2.1.1 Chemikalien.....	25
2.1.2 Antikörper	28
2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe.....	29
2.1.4 Enzyme	29
2.1.5 CRISPR-CAS9 Nuklease Produkte	30
2.1.6 Reagenzien und Verbrauchsmaterial	30
2.1.7 Geräte.....	32
2.1.8 Kits.....	34

2.2. Medien und Puffer	35
2.2.1 Puffer und Stammlösungen	35
2.2.2 Medien für Zellkulturen.....	37
2.2.3 Medium für Bakterienkulturen.....	38
2.3. Verwendete Zelllinien, <i>Toxoplasma gondii</i> und Bakterien.....	38
2.3.1 Zelllinien	38
2.3.2 Bakterien- und Toxoplasmenstämme	38
2.4. Vektoren, Oligonukleotide und Lentiviren	38
2.4.1 Plasmide	38
2.4.2 Primer	40
2.4.3 Sequenzen von Oligo-Nukleotiden und Sonden für qRT-PCR Analysen.....	41
2.4.4 Lentiviren.....	41
2.5. Statistische Analyse.....	41
3. Methoden	42
3.1. Zellbiologische Methoden.....	42
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	42
3.1.2 Kultivierung von <i>T. gondii</i>	42
3.1.3 Lentivirale Transduktion	42
3.1.4 Infektion mit <i>T. gondii</i>	43
3.1.5 <i>In vitro</i> Infektionsanalysen	43
3.1.5.1 Immunfluoreszenzfärbung für konfokal-mikroskopische Analysen und Airyscan-Mikroskopie.....	43
3.1.5.2 Immunfluoreszenzfärbung für die SIM- und STED-Mikroskopie.....	44
3.1.5.3 <i>Live Cell Imaging</i>	44
3.1.5.4 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM)	44
3.1.6 Kolokalisationsberechnungen von <i>Live Cell Imaging Movies</i>	45
3.1.6.1 Bitplane ImarisColoc Kanal	45
3.1.6.2 Korrelationsberechnung nach Pearson	45
3.1.7 DNA-Transfer in <i>T. gondii</i>	46
3.2. Proteinbiochemische Methoden	46
3.2.1 Zelllyse	46
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Pierce BCA Protein Assay Kit).....	46
3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.2.4 Western Blot (semidry).....	47
3.2.5 Sensitive Coomassie-Färbung.....	47

3.2.6	GFP-TRAP/RFP-TRAP	47
3.2.7	Malachitgrün GTPase Aktivitäts-Assay	48
3.2.8	Detektion potenzieller Lipid-Bindungen durch <i>Membrane Lipid Strips</i>	48
3.2.9	<i>Giant Unilamellar Vesicle</i> (GUV) Technologie	49
3.3.	Molekularbiologische Methoden	49
3.3.1	RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen	49
3.3.2	cDNA-Synthese	50
3.3.3	Quantitative Real-Time PCR	50
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
3.3.5	Agarosegelelektrophorese	51
3.3.6	Restriktionsverdau der DNA.....	52
3.3.7	Ligation von DNA-Molekülen	52
3.3.8	DNA-Transformation in <i>E. coli</i> Bakterien	52
3.3.9	Site-Directed Mutagenese.....	54
3.3.10	CRISPR/CAS9 System	54
4.	Ergebnisse	57
4.1.	Die Rekrutierung und Lokalisation von mGBP7 mit dem obligat-intrazellulären Parasiten <i>Toxoplasma gondii</i>	57
4.1.1	Versuchsaufbau: Infektionsanalysen mit <i>T. gondii</i>	57
	Ergebnisse: Infektionsanalysen mit <i>T. gondii</i>	58
4.1.2	Versuchsaufbau: Kolokalisationsanalysen von mGBP7 und weiteren Mitgliedern der mGBP-Familie	61
	Ergebnisse: Kolokalisationsanalyse von mGBP7 mit mGBP2	62
	Ergebnisse: Kolokalisationsanalyse von mGBP7 mit mGBP3	69
	Ergebnisse: Kolokalisationsanalyse von mGBP7 mit mGBP6	77
4.2.	Interaktionsanalyse von mGBP2 und mGBP7 mit Membranlipiden	80
	Versuchsaufbau: Interaktionsanalyse von mGBP2 und mGBP7 mit Membranlipiden	81
	Ergebnisse: Interaktionsanalyse von mGBP2 und mGBP7 mit Membranlipiden.....	82
4.3.	Untersuchung der mGBP7-Bindungsstelle für die Lipid-Interaktion	89
	Versuchsaufbau: Die Untersuchung der mGBP7-Bindestelle für Lipid-Interaktionen	89
	Ergebnisse: Die Identifikation der mGBP7-Bindestelle für Lipid-Interaktionen.....	89
5.	Diskussion	99
5.1.1	Die Interaktion von mGBP7 mit dem obligat-intrazellulären Parasiten <i>Toxoplasma gondii</i>	100

5.1.2	Kolokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und weiteren Mitgliedern der mGBP-Familie ...	102
	
	Kolokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und mGBP2	103
	Kolokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und mGBP3	106
	Kolokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und mGBP6	107
5.2.	Interaktionsanalyse von mGBP2 und mGBP7 mit Membranlipiden	109
5.3.	Untersuchungen der mGBP7-Bindungsstellen für eine Lipid-Interaktion.....	115
6.	Ausblick.....	123
	Literaturverzeichnis	125
	Eidesstattliche Versicherung.....	147
	Danksagung	148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
1: Der IFN γ -Signaltransduktionsweg	7
2: Der phylogenetische Stammbaum der murinen GBPs	9
3: Übersicht der GBP-Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Protozoen, Viren und Bakterien	11
4: Phänotypen von mGBP-defizienten Mäusen während einer <i>T. gondii</i> -Infektion	12
5: Der Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	16
6: Der Aufbau von <i>T. gondii</i>	19
7: <i>Live Cell Imaging</i> der Interaktion zwischen GFP-mGBP7 und mCH- <i>T. gondii</i>	58
8: Airyscan Mikroskopie einer mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 MEF-Zelle, infiziert mit <i>T. gondii</i>	59
9: CLEM-Mikroskopie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Hensel, Universität Osnabrück	60
10: Western Blot des Zelllysats der mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 MEF Zelllinie	62
11: Korrelation und Kolo­kalisierung der Fusionsproteine GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 während einer <i>T. gondii</i> -Infektion	63
12: Hochauflösende mikroskopische Aufnahmen der mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 MEF Zelllinie mit einer <i>T. gondii</i> -Infektion	64
13: Dynamische und zeitbedingte Rekrutierung der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine	66
14: Darstellung der Rekrutierungs- und Akkumulationsanalyse der Fusionsproteine mGBP2 und mGBP7	67
15: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine innerhalb der doppelt transduzierten MEF Zelllinien	68
16: Western Blot des Zelllysats der mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3 MEF Zelllinie	69
17: Kolo­kalisierung und Korrelation der Fusionsproteine GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP3 während einer <i>T. gondii</i> -Infektion	70

18: STED-Aufnahmen von <i>T. gondii</i> -Parasiten in mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3 MEF-Zellen	72
19: CRISPR/CAS9-Mutation von mGBP3	73
20: Darstellung der mGBP-positiven <i>T. gondii</i> -PVs der lentiviral transduzierten NIH3T3-Zelllinien aus Tabelle 2 und der lentiviral transduzierten MEF-Zelllinien aus Tabelle 3	75
21: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP3- und mGBP7-Fusionsproteine innerhalb der doppelt transduzierten mGBP3 ^{-/-} NIH3T3- und mGBP7 ^{-/-} MEF Zelllinien	76
22: Airyscan Aufnahmen der MEF mGBP7 ^{-/-} mCherry-mGBP3 Zelllinie, von der NIH3T3 mGBP3 ^{-/-} mCherry-mGBP7 Zelllinie und der doppelt transduzierten MEF Zelllinie mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3	76
23: Western Blot des Zelllysats der mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP6 MEF Zelllinie	77
24: Korrelation und Koloaliation der Fusionsproteine GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP6 während einer <i>T. gondii</i> -Infektion	78
25: STED-Aufnahmen eines <i>T. gondii</i> -Parasiten in mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP6 MEF Zellen	79
26: Airyscan Aufnahmen der doppelt transduzierten mGBP7 ^{-/-} GFP-mGBP7 mCH-mGBP6 MEF Zelllinie und von mGBP7 ^{-/-} mCH-mGBP6 MEFs	80
27: Isolation und Aufreinigung GFP-fusionierter, aktiver mGBP2- und mGBP7-Proteine	82
28: Auswertung der Membranlipidinteraktionen von GFP-gekoppelten mGBP2- und mGBP7-Proteinen	83
29: Direkte Protein-Lipid-Interaktion der Fusionsproteine mGBP2 und mGBP7 mit Phosphatidsäure und Cardiolipin	84/85
30: Analyse der Protein-spezifischen Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine an Phosphatidsäure- und Cardiolipin-GUVs	86
31: Nachweis der isolierten, aufgereinigten und aktiven mCherry-gekoppelten mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine	87
32: Interaktionsanalyse der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine in Bezug auf Lipidbindungen	88
33: Die Isolation und Aufreinigung der aktiven GFP-mGBP7-Mutantenproteine	90

34: <i>Membrane Lipid Strips</i> sowie deren quantitative Auswertung für den Nachweis der Lipid-Interaktionen der mGBP7-Mutanten	92
35: <i>In vitro</i> Lokalisation der GFP-mGBP7-Mutantenproteine im Vergleich zu GFP-mGBP7	93
36: Analyse der direkten Lipid-Interaktion der GFP-fusionierten mGBP7-Mutanten an Phosphatidsäure und Cardiolipin im Vergleich zu GFP-mGBP7	94
37: Nachweis der GFP-gekoppelten Deletionsmutanten mGBP7 ^{Δ20} und mGBP7 ^{Δ30}	95
38: Auswertung von <i>Membrane Lipid Strips</i> bezüglich der Lipid-Interaktionen der Deletionsmutanten GFP-mGBP7 ^{Δ20} und GFP-mGBP7 ^{Δ30} im Vergleich zum WT GFP-mGBP7 und der Deletionsmutante GFP-mGBP7 ^{Δ49}	96
39: <i>In vitro</i> Lokalisation sowie quantitative Auswertung der mGBP-Akkumulation an <i>T. gondii</i> -PVMs der Deletionsmutanten GFP-mGBP7 ^{Δ20} und GFP-mGBP7 ^{Δ30} im Vergleich zu GFP-mGBP7 und GFP-mGBP7 ^{Δ49}	97
40: Zusammenstellung der <i>T. gondii</i> -Akkumulationsfrequenz der mGBP7-Deletionsmutanten im Vergleich zu GFP-mGBP7	98
41: Die Struktur von PA	110
42: Die Struktur von CL	110
43: Die Struktur von PS	111
44: Die Aminosäuren-Zusammensetzung von mGBP7	113
45: Deprotonierung von PA innerhalb einer Membran mit PC durch Arginin- oder Lysin-Interaktionen	114
46: Darstellung der C-terminalen Aminosäuren von mGBP7	117
47: Schema der hypothetischen mGBP-Rekrutierung zur <i>T. gondii</i> -PVM	121/122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: mGBP2^{-/-} oder mGBP7^{-/-} MEFs wurden mit entsprechenden GFP- oder mCherry-fusionierten mGBP-Konstrukten mittels lentiviraler Transduktion erzeugt **Seite 67**

Tabelle 2: NIH3T3 mGBP3^{-/-} Zelllinien mit lentiviral transduzierten, fluoreszierenden mGBP-Proteinen **Seite 74**

Tabelle 3: MEF mGBP7^{-/-} Zelllinien mit lentiviral transduzierten, fluoreszierenden mGBP-Proteinen **Seite 74**

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin	IDO	Indoleamin 2,3-Dioxygenase
ATP	Adenosintriphosphat	IFN	Interferon
AU	Airy Unit	IL	Interleukin
BCR	B-Zell Rezeptor	iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
BSA	Rinderserumalbumin	IRGs	<i>immunity related GTPases</i>
cDNA	DNA-Kopie der mRNA	IRF1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
CL	Cardiolipin	JAK	Januskinase
CLEM	Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie	kDA	Kilodalton
d	Tag	KO	<i>knockout</i>
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindol	LPS	Lipopolysaccharid
dH₂O	destilliertes Wasser	LTA	Lipoteichonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	M	Molar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
dNTP	Desoxyribo-Nukleotide	MBL	<i>mannan-binding lectin</i>
dpi	<i>days post infection</i>	mCH	mCherry
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MEF	murine embryonale Fibroblasten
ESA	<i>Excreted Secreted Antigens</i>	MHC	<i>major histoncompatibility class</i>
EtOH	Ethanol	min	Minute(n)
FKS	Fötale Kälberserum	MMR	Makrophagen Mannose Rezeptor
GAF	<i>gamma interferon activator factor</i>	NK-	<i>Natural Killer Cells</i>
		Zellen	
GAS	<i>gamma activated site</i>	PA	Phosphatidsäure
GBP	Guanylat-bindendes Protein	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
GDP	Guanosindiphosphat	PC	Phosphatidylcholin
GFP	grün fluoreszierendes Protein	pDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
GMP	Guanosinmonophosphat	PFA	Paraformaldehyd
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	PS	Phosphatidylserin
GRA	Proteine der dichten Granula	PV	Parasitophore Vakuole
GTP	Guanosintriphosphat	PVM	Parasiophore Vakuolen-Membran
GUV	<i>Giant Unilamellar Vesicles</i>	RFP	rot fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)	RNA	Ribonukleinsäure

ROI	<i>Region of Interest</i>
RON	<i>Rhoptry neck Protein</i>
ROP	<i>Rhoptry bulb Protein</i>
rpm	<i>round per minutes</i>
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>serum amyloid protein</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SIM	<i>Structured Illumination Microscopy</i>
SOCS	<i>supressor of cytokine signaling</i>
SRs	Scavenger Rezeptoren
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STED	<i>Stimulated Emission Depletion Microscopy</i>
TCR	T-Zell Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TLRs	Toll-like Rezeptoren
üN	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
VLIGs	<i>very large inducible GTPases</i>
VLS	<i>vesicle like structures</i>
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Krankheit Toxoplasmose resultiert aus einer Infektion mit dem obligat-intrazellulären Protozoon *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Insbesondere immunsupprimierte Personen und Frauen mit einer erstmaligen Infektion während einer Schwangerschaft gelten als gefährdet und können schwerwiegende Krankheitsbilder bedingt durch eine Toxoplasmeninfektion ausbilden. Die transplazentare Übertragung von *T. gondii* führt in vielen Fällen zu Missbildungen des Fötus, sowie zu Fehl- und Totgeburten. In Mausmodellen und *in vitro* Experimenten mit einer fehlenden Interferon- γ (IFN γ) Produktion wurden ebenfalls Defekte bei einer effektiven Immunabwehr gegen *T. gondii* detektiert. Im Zuge der Invasion in Wirtszellen bildet der Parasit ein spezifisches subzelluläres Membrankompartiment aus, die parasitophore Vakuole (PV). Die PV dient als wichtiger Schutzmechanismus für die parasitäre Replikation innerhalb der Wirtszelle und den Stadienwechsel von den akut infektiösen Tachyzoiten zu den chronisch persistierenden Bradyzoiten.

Das Zytokin IFN γ beeinflusst die Stimulation hunderter Gene mit wichtigen Funktionen in der Immunabwehr, unter anderem gegen *T. gondii*. Die murinen Guanylat-bindenden Proteine (mGBPs) sind IFN γ induzierbare Dynamin-ähnliche GTPasen, welche in den meisten Zelltypen exprimiert werden und eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Kontrolle der Parasiten-Replikation einnehmen. Mitglieder der mGBPs, insbesondere mGBP2 und mGBP7, assemblieren an die zytoplasmatische Seite der *T. gondii*-PV und interagieren mit Membrankomponenten durch einen noch uncharakterisierten Mechanismus.

In dieser Forschungsarbeit wurde die Interaktion des mGBP7-Proteins mit *T. gondii*-Parasiten untersucht. Es wurde beobachtet, dass mGBP7 direkt an die PV-Membran (PVM) und nach einer Ruptur der PVM auch direkt an der Parasiten-Plasmamembran akkumulieren kann. Elektronenmikroskopisch konnten in Bereichen, in denen mGBP7 lokalisiert, tubuläre Proteinstrukturen nachgewiesen werden, deren Identität jedoch noch nicht final geklärt wurde und weitere Untersuchungen erforderlich machen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mGBP7 mit weiteren mGBP-Proteinen im Zytoplasma und an der PV kolokalisieren kann. mGBP7 zeigte Kolokalisation mit mGBP6 an der PV-Membran und zu einem hohen Maß mit mGBP3, sowohl im Zytosol als auch direkt an dem Parasiten. Dabei bestand keine gegenseitige Beeinflussung der mGBPs in Bezug auf die Rekrutierungsfähigkeit zum Parasiten, da die Rekrutierung von mGBP3 und mGBP6 auch in mGBP7^{-/-} MEF-Zellen erfolgte. Zwischen mGBP7 und mGBP2 bestand keine Kolokalisation, doch hat mGBP2 einen deutlichen Effekt auf die mGBP7-Rekrutierung an die PV. Es konnte eine Rekrutierungs-Hierarchie postuliert werden, bei der mGBP2 eine primäre Rekrutierung nach einer *T. gondii*-Infektion zukommt. mGBP7 wird nachfolgend an die PV des Parasiten assoziiert. Die direkte Protein-Lipid-Interaktion an der *T. gondii*-PV oder an der Plasmamembran galt stets als schwierig aufzuklären, da eine hochreine PV-Isolation bisher nicht möglich war. Zur Umgehung dieses Problems wurden *Membrane Lipid Strips* und die GUV-Technologie (*giant unilamellar vesicles*) eingesetzt. Dabei wurden signifikante Affinitäten und eine direkte Bindung von mGBP2- und mGBP7-Proteine an die Lipide Phosphatidsäure (PA) und Cardiolipin (CL) nachgewiesen. Mutations- und Trunktionsanalysen an mGBP7 lieferten Hinweise darauf, dass die Akkumulation von mGBP7 an PA

auf elektrostatische Verbindungen und positiv geladenen Aminosäuren basieren könnte. Die Bindung von mGBP7 an CL ist vermutlich auf hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen. Zudem ist für mGBP2 bekannt, dass ein C-terminales Isoprenylierungsmotiv (CaaX) die Membranbindung fördert und verankert. Das mGBP7-Protein weist diese CaaX-Box nicht auf, dennoch konnte eine ähnliche Funktion für die C-terminalen 49 Aminosäuren festgestellt werden. Bei einer Deletion dieser Aminosäuren verringerte sich die Akkumulation von mGBP7 an der *T. gondii*-PV auf ein Minimum.

Die Detektion von CL und PA als interagierende Lipide für mGBP2 und mGBP7, sowie die spezifischen Bindungseigenschaften der Proteine, können zu der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden gegen *T. gondii* beitragen.

Summary

Toxoplasmosis is a disease that results from infection with the obligate intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Patients with immunodeficiencies and pregnant women with a first-time *T. gondii*-infection show serious disease. The transplacental transmission of *T. gondii* can lead to malformations of the unborn child but most of the time it ends in miscarriages or stillbirths. Mouse models and *in vitro* experiments with a defective interferon- γ (IFN γ) production demonstrate serious deficiencies in effective immune responses against *T. gondii*. After invasion of target cells, *T. gondii* creates a specific membranous subcellular compartment, the parasitophorous vacuole (PV). The PV acts like a defense wall against the immune system and enables the parasite's replication and the differentiation of the acute infectious tachyzoites into chronically persisting bradyzoites.

IFN γ is a major cytokine that mediates the stimulation of hundreds of genes that play important roles in the immune defense against *T. gondii* and other pathogens. The murine guanylate binding proteins (mGBPs) are IFN γ -inducible dynamin-like GTPases which are expressed in most cell types and show a crucial function for the control of intracellular parasite replication. Members of the mGBP family, in particular mGBP2 and mGBP7, assemble at the cytoplasmic side of the PV and interact with membrane compartments via yet uncharacterized mechanisms.

This research thesis aimed at studying the molecular mechanisms by which mGBP7 impairs the vital functions of *T. gondii* by accumulating directly at the PV membrane and, after its disruption, also at the parasite's plasma membrane. This effect subsequently leads to the parasite's death by an unknown mechanism. Via electron microscopy it was shown that tubular protein structures can be found in areas where mGBP7 is localized. However, the identity of these structures has yet to be finally elucidated and requires further investigation. Additionally, mGBP7 colocalizes with further members of the mGBP family. mGBP7 colocalized with mGBP6 at the *T. gondii*-PV as well as with mGBP3 in the cytosol and at the parasite's membranes. No mutual interference in recruitment towards the *T. gondii* PV could be shown for these pairs of mGBPs since the accumulation of mGBP3 and mGBP6 in mGBP7^{-/-} cells appeared undisturbed. Thus, the implications of these colocalizations need to be further analyzed. The case is different for the interaction between mGBP2 and mGBP7. No colocalization could be observed for these proteins, although a clear influence of mGBP2 on mGBP7 was determined. Thus, a hierarchy of recruitment towards the parasite could be postulated for mGBP2 and mGBP7, where mGBP2 represents the primary association at the *T. gondii* PV, followed by a secondary accumulation by mGBP7. Within this investigation, it became obvious that the absence of mGBP2 led to a significant defect on the mGBP7 accumulation at *T. gondii*. In the past, direct protein-lipid-interactions at the *T. gondii*-PV or plasma membrane have been difficult to analyze because of the highly pure isolation of the parasite's membranes has not been possible up to now. To circumvent this problem, Membrane Lipid Strips and the GUV-technology (giant unilamellar vesicles) were used. Here, it was possible to detect significant and specific binding affinities of mGBP2 and mGBP7 to the membrane lipids phosphatidic acid (PA) and cardiolipin (CL).

Mutational and truncation analyses of mGBP7 suggested that interactions of mGBP7 with PA may be based on electrostatic interactions and positive charged amino acids. The binding of mGBP7 to CL is

likely based on hydrophobic and electrostatic interactions. Additionally, mGBP2 contains a C-terminal isoprenylation motif (CaaX) that enables membrane binding effects. In contrast, mGBP7 does not contain an isoprenylation motif. However, the C-terminal 49 amino acids were demonstrated to perform a similar function. The deletion of these amino acids resulted in a nearly complete ablation of *T. gondii* targeting by mGBP7.

The detection of CL and PA as interacting lipids of the mGBP2 and mGBP7 proteins plus their specific binding properties might contribute to the understanding of Toxoplasmosis and to the development of new treatment opportunities in the long term.

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Eine wichtige Grundlage für ein gesundes und ausgeglichenes Leben mit einem funktionierenden Schutzmechanismus gegen pathogene Organismen wie Pilze, Bakterien, Viren oder Parasiten bietet das Immunsystem der Wirbeltiere. Dabei handelt es sich um ein hochkomplexes System aus primären und sekundären Organen, Zellen mit spezifischen Eigenschaften, Immunglobuline für eine spezifische Detektion von Pathogenen und Mediatoren, die als Botenstoffe ausgeschüttet werden. Die wichtigste Funktion des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen. Dadurch wird der Körper vor eintretenden Pathogenen geschützt und eine Autoimmunreaktion vermieden. Die Pathogenabwehr des Körpers beginnt mit anatomischen Barrieren wie der Haut, den Schleimhäuten, Nasenhaaren oder Flimmerhärchen auf der Bronchialschleimhaut sowie Enzymen im Speichel oder in der Tränenflüssigkeit. Gegen eine orale Aufnahme pathogener Erreger wirkt die Magensäure (Janeway, 2001). Werden derartige Barrieren durch einen Krankheitserreger überwunden, treten zwei funktionell verschiedene, spezifiziertere Abwehrsysteme in Kraft. Hier wird zwischen der angeborenen Immunabwehr und der erworbenen, adaptiven Immunabwehr unterschieden. Bei der angeborenen Immunreaktion handelt es sich um eine unspezifische Abwehr, die im Allgemeinen körperfremde Bestandteile mit Hilfe von Makrophagen und Monozyten als Fresszellen, Mastzellen, Granulozyten sowie natürlichen Killerzellen und Dendritischen Zellen, abbaut (Janeway, 2001). Diese Zelltypen bilden die Schnittstelle zu der spezifischen, adaptiven Immunreaktion, welche nach einem erstmaligen Kontakt zum Krankheitserreger entwickelt wird. Es entstehen pathogen-spezifische B- und T-Zellen. Sie bieten eine maximale Effektivität für die Eliminierung von Pathogenen und entwickeln ein sogenanntes „immunologisches Gedächtnis“ für nachfolgende Infektionen mit dem gleichen Erreger. Diese werden daraufhin deutlich schneller, effektiver und spezialisierter von diesem Antigen-spezifischen System bekämpft (Goodnow et al., 2010; Janeway, 2001).

Die Leistungsfähigkeit des Immunsystems ist entscheidend für einen Krankheitsausbruch nach einer Infektion und für ihren Verlauf. Bei einem intakten Schutzmechanismus des Körpers verlaufen Infektionen meist unbemerkt und kurzzeitig. Ist diese Leistungsfähigkeit durch andere immunbeeinflussende Effekte wie zum Beispiel immunschwächende Krankheiten wie AIDS, immunsuppressive Medikamente, äußere Einflüsse wie Stress oder durch stark virulente Erreger gestört, führt dieser Effekt zu einem Krankheitsausbruch mit teilweise schwerwiegenden Folgen.

1.1.1 Das angeborene, unspezifische Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist Teil einer Immunantwort, die sich nicht in Anpassung an ein Antigen und somit an den entsprechenden Krankheitserreger ändert. Diese Immunreaktion hat sich bereits früh in der Evolution der Wirbeltiere entwickelt und gilt als essenzieller Faktor bei der Pathogenabwehr. Sind die zuvor beschriebenen anatomischen Barrieren von einem Pathogen überwunden, werden die Komponenten des angeborenen Immunsystems aktiviert. Dessen Bestandteile sind humorale Faktoren sowie Leukozyten. Diese zirkulieren im Blut oder wandern ins

periphere Gewebe nach ihrer Differenzierung (Janeway, 2001). Granulozyten sind die häufigste Art der weißen Blutzellen und können in drei Zelltypen unterteilt werden: Neutrophile sind für den Verdau von Pathogenen verantwortlich (Massberg et al., 2010), Basophile detektieren Erreger, was zu einer Histamin-Ausschüttung und einer daraus resultierenden, lokalen Entzündungsreaktion führt. Der dritte Zelltyp sind die Eosinophilen, die durch einen an Immunglobulin-E Antikörper gebundenes Pathogen aktiviert werden. Durch Exozytose sekretieren sie lysosomale, hydrolytische Enzyme und Peroxidasen und fördern den Abbau des Erregers (Nussbaum et al., 2013). Ein weiterer spezifischer Zelltyp des Immunsystems sind die Monozyten. Sie differenzieren zu Makrophagen und Dendritischen Zellen unter inflammatorischen Aspekten und können phagozytotisch agieren. Des Weiteren gibt es NK-Zellen (*natural killer cells*), die zytotoxisch gegenüber abnormalen (Tumor-) Zellen oder virusinfizierten Zellen sind. Sie detektieren unter anderem eine veränderte MHC I (*major histocompatibility class I*)–Molekülexpression auf der Zelloberfläche. Es handelt sich bei NK-Zellen um IL-12 bzw. IL-15 induzierte Zellen (Interleukine, eine Klasse der Zytokine) (Brodin et al., 2010; Ljunggren und Karre, 1990). Mastzellen befinden sich hauptsächlich in Bindegeweben und Schleimhäuten und sekretieren nach ihrer Freisetzung Histamine, Chemokine und Zytokine. Daraus resultiert eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen zu den Entzündungsherden. Proteine des Komplementsystems wirken als Marker für die Identifizierung von Pathogenen und fördern den Verdau durch phagozytotische Fresszellen. Die Akute-Phase-Proteine lokalisieren Entzündungsreaktionen. Makrophagen, Killerzellen, Fibroblasten und weitere immunologisch relevante Zelltypen produzieren wichtige Botenstoffe des Körpers, die Zytokine (Janeway, 2001).

Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems besteht darin, einen pathogenen Erreger als körperfremd zu detektieren. Dafür nutzt die angeborene Immunität ein genetisch festgelegtes Erkennungssystem von molekularen Mikroben-Mustern. Diese Pathogen-assoziierten molekularen Oberflächenmuster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) (Janeway und Medzhitov, 2002) werden durch spezifische Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt und als körperfremd klassifiziert (Hoffmann et al., 1999; Janeway und Medzhitov, 2002). Die PRRs befinden sich auf Zelloberflächen von Makrophagen und Dendritischen Zellen sowie in intrazellulären Kompartimenten. Manche PRRs werden in den Blutkreislauf oder in Gewebeflüssigkeiten sekretiert. Das funktionelle Spektrum der spezifischen PAMP-Erkennung beinhaltet neben der Detektion durch PRRs die Opsonisierung, bei der die Pathogenoberfläche mit Antikörpern und Komplementsystem-Proteinen bedeckt wird. Jener Effekt führt zu einer Aktivierung von verschiedenen Kaskaden aus dem Komplementsystem, proinflammatorischen Signalwegen und der Erzeugung des genetisch programmierten Zelltodes (Janeway und Medzhitov, 2002). Makrophagen-spezifische Oberflächen-PRRs erkennen Moleküle auf einer Pathogenoberfläche. Durch diese Bindung werden beispielsweise die phagozytotischen Funktionen der Makrophagen aktiviert, welche zum Abbau des Erregers führen. Wichtige PRR-Vertreter sind unter anderem MMRs (Makrophagen Mannose Rezeptoren), SRs (*Scavenger* Rezeptoren) und TLRs (*Toll-like* Rezeptoren). Der MMR Rezeptor interagiert mit einer hohen Anzahl an Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie mit Pilzen (Fraser et al., 1998). Der Makrophagen-SR (MSR) zeigt eine besondere Spezifität gegenüber polyanionischen Liganden wie

beispielsweise doppelsträngiger RNA, Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA) (Pearson, 1996). *Toll-like* Rezeptoren kommen sowohl an der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten vor (Medzhitov et al., 1997). Bis zu 15 verschiedene TLRs (im Menschen 10 und in der Maus 12) werden von Makrophagen und Dendritischen Zellen als auch von Granulozyten, Epithelzellen und Keratinozyten exprimiert (Akira und Takeda, 2004; Chuang und Ulevitch, 2000; Du et al., 2000; Kawai und Akira, 2010; Medzhitov et al., 1997). Durch die hohe Spezifität der verschiedenen TLRs können unterschiedliche, pathogen-assoziierte Strukturen erkannt werden. Endosomale TLRs erkennen spezifisch Nukleinsäuren (z.B. während einer Virusinfektion), externe TLRs erkennen zum Beispiel Lipopolysaccharide von Gram-negativen Bakterien oder auf speziellen Lipiden (Poltorak et al., 1998; Shigeoka et al., 2007; Yamamoto et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Die TLR-spezifisch aktivierten Signalkaskaden sind abhängig von Adaptermolekülen wie MyD88, Tirap, Trip und Tram (Kawai und Akira, 2010; Shiloh et al., 1999; Yamamoto et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Derartige Signalwege können zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB führen. NFκB induziert die Expression inflammatorischer Zytokine und aktiviert den MAP-Kinase-Weg (*mitogen activated kinases*), der neben anderen an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt ist (Williams, 1999). Sekretierte PRRs sind beispielsweise das MBL (*mannan-binding lectin*), das CRP (*C-reactive protein*) und das SAP (*serum amyloid protein*). Diese PRRs werden in der Leber während einer frühzeitig erkannten Infektion produziert und folglich sekretiert (Fraser et al., 1998; Gewurz et al., 1982; Schwalbe et al., 1992). Sowohl CRP als auch SAP agieren als Opsonine und bedecken durch die Bindung an Phosphorylcholin die Bakterienoberfläche (Agrawal et al., 2001). Zusätzlich können sie sich an die erste Unterkategorie des C1 Komplexes binden (Proteinkomplex des Komplementsystems) und eine Aktivierung des Komplementsystems hervorrufen (Agrawal et al., 2001). Das MBL bindet an Mannose-Resten, die gewöhnlich in hoher Anzahl auf der Zelloberfläche vieler Mikroorganismen vorzufinden sind. Dadurch bedingt werden MBL-assoziierte Serinproteasen (MASP1 und MASP2) mit spezifischen Abspaltungsmechanismen aktiviert (Fraser et al., 1998). Das Zusammenspiel sekretierter und oberflächengebundener PRRs mit PAMPs ist durch Komplementsystem-Proteine möglich, wovon mehr als 25 Proteine an Zelloberflächen binden können. Sie dienen als Marker zur Identifizierung einer pathogenen Zelle und fördern ihren Verdau (Hoffmann et al., 1999; Janeway, 2001; Janeway und Medzhitov, 2002).

Die angeborene Immunität mit ihren Signalkaskaden und Abbauprozessen spielt ab dem Tag der Geburt eine bedeutende Rolle und übernimmt einen Großteil der Pathogenabwehr. Wegen eines beschränkten Repertoires an PAMPs für Erreger, beinhaltet dieses System Lücken. Die Pathogen-assoziierten Erkennungsmuster haben sich im Laufe der Evolution teilweise verändert oder neu generiert. Folglich ist das angeborene Immunsystem der Wirbeltiere unzureichend für eine effektive Abwehr aller Erreger. Um dem evolutionären Druck nicht zu unterliegen, entwickelte sich die spezifische, erworbene Immunität.

1.1.2 Das spezifische, erworbene Immunsystem

Das spezifische, erworbene Immunsystem umfasst vier charakteristische Eigenschaften, die sich zumindest teilweise von der angeborenen Immunität unterscheiden: Antigenpezifität,

Unterscheidungsfähigkeit von körpereigen und körperfremd, eine Abwehrreaktion gegenüber einem breiten Spektrum körperfremder Moleküle und ein immunologisches Gedächtnis (Janeway, 2001).

Die Antigenpezifität basiert auf den zellulären Hauptbestandteilen der adaptiven Immunreaktion, den Lymphozyten. Die Lymphozyten repräsentieren einen hämatopoetischen Zelltyp, der ein universelles Vorkommen in Wirbeltieren aufweist. Informationen über einen vergleichbaren Zelltyp in Chordatieren ist nicht dokumentiert (Boehm, 2011). Das Immunsystem der Wirbeltiere zeichnet sich durch zwei lymphoide Zelltypen aus, die sich aus den gleichen Vorläuferzellen im Knochenmark entwickeln (Janeway, 2001). Diese Dichotomie reflektiert die genetische Regulation der T-Zell- und B-Zell-Entwicklung, die separierte anatomische Lokalisation und die funktionale Differenzierung ihrer Antigenrezeptoren (David et al., 1988; Dias et al., 2008; Kasamatsu et al., 2010; Pancer et al., 2004; Sakano et al., 1979). Die primäre spezifische Immunantwort benötigt Zeit für die Ausbildung wirksamer Abwehrmechanismen bei einer Erstinfektion. Dies beruht auf der pathogen-spezifischen Differenzierung und Expression der T- und B-Zellen. Bei sekundären und weiteren Infektionen werden Abwehr-Prozesse aktiviert, die auf bereits entwickelte und trainierte Zellen zurückgreifen können. Dadurch kommt es zu einer schnelleren und effektiveren Pathogenabwehr. Die Entwicklung und Aktivierung der T-Zellen ist eine zelluläre Immunantwort. Diese richtet sich gezielt gegen Antigene körperfremder Organismen oder gegen Tumorzellen, die innerhalb eines Organismus auftreten. Antigene werden durch spezifische, integrale Membranproteine, den T-Zell Rezeptoren (TCR), detektiert. Die TCRs ähneln in Struktur und Funktion den Immunglobulinen und deren spezifischen, molekularen Konfigurationen. Mit Hilfe der TCRs werden MHC-Komplex-assoziierte Antigene erkannt und gebunden. Diese Bindung bewirkt eine Immunreaktion, die unter anderem zum Abbau der antigenenthaltenden Zelle oder zur Aktivierung durch Zytokine führen kann. Die zytotoxische CD8+ T-Zelle erkennt und bindet MHC-I gebundene Antigene und initiiert zytotoxische Immunreaktionen mit vollständigem Zellabbau (Sugamura et al., 2004; Williams et al., 1991). Die CD4+ T-Helfer Zellen (T_H) binden an MHC-II gebundene Antigene. Diese T_H -Zellen differenzieren je nach Stimulation spezieller Zytokine und Interleukine in weitere sub-Populationen. Bekannt sind derzeit die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), folliculäre T_H -Zellen (T_{FH}), und verschiedene T_H -Subtypen wie T_{H17} , T_{H1} , T_{H9} und T_{H2} , jeweils mit spezifischen Funktionen (Bluestone et al., 2009; Boehm und Swann, 2014; Janeway, 2001). Durch die Pathogen-Interaktion der T_H -Zellen werden sowohl zelluläre, zum Abbau führende als auch humorale Immunantworten reguliert. Die humorale Immunantwort beschreibt eine spezifische Reaktion gegen Erreger im Blut, in der Lymphe und in den interstitiellen Flüssigkeiten. B-Zellen verfügen über oberflächengebundene B-Zell Rezeptoren (BCR) (Hombach et al., 1990; Reth, 1992). Eine Bindung an körperfremde Antigene durch spezifische BCRs (ähnelt TCRs), bewirkt einen B-Zell-Reifungsprozess. Dieser Prozess führt zu einer Zell-Differenzierung in Plasmazellen (oder auch B-Effektorzellen) mit spezifischer Antikörper-Produktion (Janeway, 2001). Durch den Differenzierungsprozess der antigenbindenden-B-Zelle entstehen neben Effektorzellen ebenfalls B-Gedächtniszellen. Diese langlebigen Zellen dienen im Falle einer erneuten Infektion einer schnelleren Immunreaktion. Es findet ein sofortiger Differenzierungsprozess mit der Entwicklung effektiver, antikörperproduzierender B-Zellen statt (Dias et al., 2008; Janeway, 2001; Ramirez et al., 2010).

1.2. Zytokine

Zytokine sind wichtige Botenstoffe immunologischer Abwehrmechanismen und Zellregulationen. Sie ähneln hormonellen Substanzen und dienen der Informationsübertragung zwischen beteiligten Komponenten des Immunsystems. Wichtige Vertreter der Zytokine sind die Interleukine (IL) („zwischen Leukozyten“), die Interferone (*lat. interferre* - eingreifen), die Koloniestimulierenden Faktoren (CSFs, *colony-stimulating factors*) und Zytokine der TNF-Superfamilie. In Bezug auf die Thematik dieser Forschungsarbeit werden nachfolgend die Interferone, und insbesondere das Interferon- γ , beschrieben.

Interferone

Die Entdeckung des Interferons aus infizierten, bebrüteten Hühnereiern Mitte des 20. Jahrhunderts ließ auf eine antivirale Substanz mit einem natürlichen Ursprung schließen (Isaacs und Lindenmann, 1957). Die charakteristische Eigenschaft der Glykoproteine Interferone (IFN) als wichtige Signalmoleküle der immunregulatorischen Informationsübertragung, klassifiziert sie zu Zytokinen. Es ist bekannt, dass eine Interferon-Produktion als Reaktion auf pathogene Erreger, aber auch auf veränderte (Tumor-) Zellen eingeleitet wird (Janeway, 2001). Inzwischen sind insgesamt zehn Interferone in Säugetieren beschrieben (davon sieben verschiedene in Menschen), welche anhand ihrer Rezeptorspezifität in drei Unterkategorien eingeteilt werden (Chelbi-Alix und Wietzerbin, 2007; Pestka, 2000). Die zahlenmäßig größte Unterkategorie stellen die Typ I Interferone dar. Mit den Interferonen IFN α , IFN β , IFN ω , IFN ϵ und IFN κ wird dieser Unterkategorie eine zentrale Rolle in der immunregulatorischen Pathogenabwehr zugeschrieben, insbesondere bei der viralen Abwehr (Garcia-Sastre et al., 1998; Van Hove et al., 2009). Sie werden hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen und Fibroblasten produziert (Schroder et al., 2004) und binden an einen spezifischen IFN- α Rezeptor (IFN α R). Zu der Klasse der Typ II Interferone gehört das Interferon- γ (IFN γ). Dieses Interferon unterscheidet sich sowohl genetisch als auch strukturell von den Typ I Interferonen und bindet an einen eigenen IFN γ -Rezeptor (IFN γ R) (Pestka, 2007). Es zeigt eine besonders starke Regulationsfunktionalität auf mehrere hundert Gene (Boehm et al., 1997; Der et al., 1998) und wird vorwiegend von aktivierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, von NK-Zellen, B-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APCs) produziert (Billiau, 1996; Boehm et al., 1997; Mosmann und Coffman, 1989; Sad und Mosmann, 1995; Schroder et al., 2004). Die Typ III Interferone zeigen strukturelle und regulatorische Ähnlichkeiten zu den Typ I Interferonen, werden von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) produziert (Kotenko et al., 2003; Mordstein et al., 2008) und binden an einen spezifischen, heterodimeren IFN λ -Rezeptor (Bartlett et al., 2005).

Interferon- γ

Zytokine können auf vielen verschiedenen Wegen Zellsysteme regulieren. Dies kann synergistisch oder antagonistisch verlaufen und eine gegenseitige Hoch- oder Herunterregulation bei der Expression und Aktivität hervorrufen. Das Typ II Interferon, IFN γ , ist ein wichtiger Bestandteil der Immunreaktion auf pathogene Erreger und wird wie bereits beschrieben, vorwiegend von aktivierten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, von NK-Zellen, B-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APCs) produziert (Boehm et al., 1997; Mosmann und Coffman, 1989; Sad und Mosmann, 1995; Schroder et

al., 2004). Die biologische Funktion des proinflammatorischen IFN γ (Boehm et al., 1997) erwies sich protektiver als zu Beginn seiner Entdeckung vermutet (Schroder et al., 2004). IFN γ reguliert und aktiviert eine Vielzahl proinflammatorischer Parameter wie beispielsweise IL-12 (Ma et al., 1996; Yoshida et al., 1995), IL-15 (Doherty et al., 1996), TNF α (*tumor necrosis factor- α*) (Hayes et al., 1995), die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Xie et al., 1993), das proteolytische Enzym Caspase 1 (Tamura et al., 1996), synergistisch mit TNF den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B (Cheshire und Baldwin, 1997) und andere IFN γ -induzierbare Proteine. Zusätzlich wurde IFN γ als ein Faktor bei mehreren Modellen inflammatorischer und autoimmuner Krankheiten charakterisiert, wie beispielsweise beim insulinabhängigen *Diabetes mellitus* (Nicoletti et al., 1996), *Myasthenia gravis* (Zhang et al., 1999) und bei der *Lupus-Nephritis* (Schwartzing et al., 1998). Die antivirale Aktivität von IFN γ und den induzierbaren Proteinen konnte unter anderem in der Inhibition bei einer Herpes-simplex-Virusinfektion (HSV) (Feduchi und Carrasco, 1991) und durch eine Infektionsresistenz gegen *Listeria monocytogenes* (Dunn und North, 1991) und *Toxoplasma gondii* nachgewiesen werden (Sibley et al., 1991). Auch bei der *Chlamydia trachomatis*-Infektion spielt IFN γ eine wichtige Rolle (Taylor und Feng, 1991). Die biologische Aktivität wird bei IFN γ in Form eines Homodimers aus zwei assoziierten, anti-parallelen Monomeren ausgeübt (Ealick et al., 1991). In dieser dimerisierten Form bindet IFN γ an einen spezifischen Glykoproteinrezeptor, bestehend aus zwei Untereinheiten. Die IFN γ -Rezeptor-Untereinheiten interagieren jeweils mit Vertretern der Januskinasen (JAK) (Darnell et al., 1994; Ihle und Kerr, 1995). Januskinasen sind zytoplasmatische Tyrosinkinasen und werden durch eine Autophosphorylierung von JAK2 und der darauffolgenden Transphosphorylierung von JAK1 aktiviert. Folglich wird die IFN γ R1-Untereinheit phosphoryliert. Dieser Effekt veranlasst die Rekrutierung und Aktivierung des Transkriptionskoaktivators STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) (Briscoe et al., 1996; Greenlund et al., 1994) und führt zu einer STAT1 Homodimer-Bildung. Diese werden als GAF (*gamma interferon activator factor*) bezeichnet. GAF bindet an spezifische Promotor-Sequenzen im Genom (GAS, *gamma activated site*), wodurch regulatorische, transkriptionelle Prozesse gesteuert werden können (Boehm et al., 1997; Schroder et al., 2004). Die regulatorischen Effekte von IFN γ sind nicht kontinuierlich und werden durch eine Interaktion mit Inhibitoren reduziert (Darnell et al., 1994; Stark et al., 1998). Die bekanntesten Inhibitoren sind SOCS Proteine (*suppressor of cytokine signaling*). Diese können an JAKs binden und inhibieren, wodurch der IFN γ R-Komplex dissoziiert oder ebenso wie das IFN γ vollständig abgebaut wird (Anderson et al., 1983; Hilton et al., 1998; Krebs und Hilton, 2001; Schreiber und Farrar, 1993).

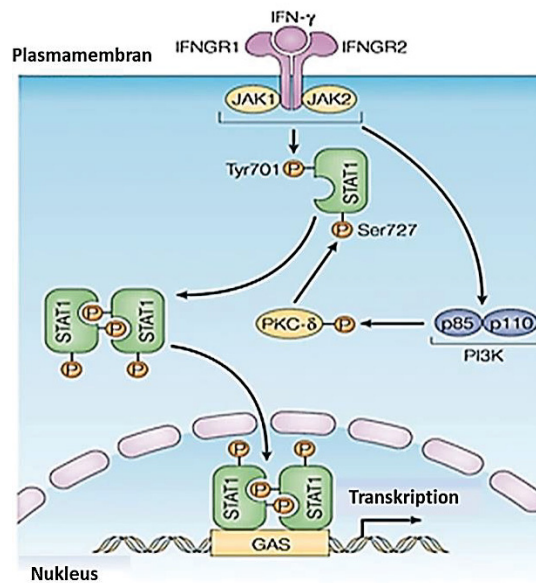


Abbildung 1: Der IFN γ -Signaltransduktionsweg. Das Ligandenmolekül IFN γ bindet an die IFN γ R-Untereinheiten, welche einen Rezeptorkomplex bilden und JAK-Proteine aktivieren. Diese übertragen phosphorylierte Tyrosinreste an STAT1, wodurch dieses mit weiteren phosphorylierten, aktivierten STAT-Molekülen einen GAF-Komplex bildet. Eine Serin-Phosphorylierung kann auch über die Proteinkinase C Isoform PKC δ stattfinden. Der GAF-Komplex bindet an die GAS-Sequenz im Nukleus und aktiviert die Transkription spezifischer Gene (Quelle: Biologics International Corp, Introduction of Type II Interferon).

Es wurde bereits früh erkannt, dass eine Vielzahl der IFN-induzierbaren Moleküle GTP-bindende Proteine sind (Cheng und Townley, 1983; Martens und Howard, 2006; Staeheli et al., 1984). Diese Dynamamin-ähnlichen, IFN-induzierbaren GTPasen konnten aufgrund von Sequenzhomologien, Größe und Vorkommen in vier Kategorien eingeteilt werden. Die Mitglieder der Mx-Familie zeigen eine antivirale Eigenschaft und eine primäre Induktion durch Typ I Interferone. Die VLIGs (*very large inducible GTPases*) werden sowohl durch Typ I als auch durch Typ II Interferone induziert (Klamp et al., 2003). Die p47 GTPasen werden hauptsächlich durch IFN γ induziert, können jedoch ebenfalls durch IFN α , IFN β sowie LPS stimuliert werden. Diese GTPasen werden auch als IRGs (*immunity related GTPases*) bezeichnet und gehören zu den am besten untersuchten IFN-induzierbaren GTPasen. Namensgebend ist ihr Molekulargewicht von 47 kDa. Im Menschen existiert ein homologer Vertreter (IRGM), in der Maus konnten bislang 23 Gene identifiziert und als wichtige antimikrobielle Effektorproteine charakterisiert werden (Boehm et al., 1998; Collazo et al., 2001; Gilly und Wall, 1992; Lafuse et al., 1995; MacMicking, 2004; Pilla-Moffett et al., 2016; Sorace et al., 1995; Steinfeldt et al., 2015). Die vierte Kategorie umfasst die p65 GTPasen, auch Guanylat-bindende Proteine (GBPs) genannt, die primär durch das Typ II Interferon induziert werden und sowohl im Menschen als auch in der Maus antivirale Effekte aufzeigen (Boehm et al., 1998; Martens und Howard, 2006). Die murinen und humanen GBPs teilen einen hohen Grad an Homologie.

In dem nachfolgenden Abschnitt werden die IFN γ -induzierbaren murinen GBPs detaillierter beschrieben und ihre Rolle in parasitären Infektionen weiter erläutert.

1.3. Die p65 murinen Guanylat-bindenden Proteine

Die Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) wurden bereits 1979 als Interferon-induzierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 65-73 kDa charakterisiert (Gupta et al., 1979). Weitere Studien identifizierten die namensgebende Bindungsaffinität zu den Guanylaten GTP, GDP und GMP (Cheng und Townley, 1983; Cheng et al., 1985). Bisher konnten in verschiedenen Spezies der Wirbeltiere GBPs nachgewiesen werden, wie im Menschen, in der Maus, im Huhn oder in Fischen (Asundi et al., 1994; Boehm et al., 1998; Cheng et al., 1991; Li et al., 2009; Nguyen et al., 2002). Interferone sind nicht die einzigen Induktionsfaktoren für diese GTPasen. Es wurden unter anderem TNF α und LPS als induzierende Faktoren festgestellt (Degrandi et al., 2007), allerdings gleicht die Induktionsstärke nicht der IFN Typ II-Stimulation (Decker et al., 1989; Decker et al., 1991; Lew et al., 1991). Durch die Entdeckung einer antiviralen Rolle von überexprimiertem humanen GBP1-Protein während einer VSV (*vesicular stomatitis virus*)- sowie bei einer Encephalomyocarditis-Virus-Infektion wurde in den 90er-Jahren die bedeutende Funktion der GBPs in der Immunabwehr initial beschrieben (Anderson et al., 1999). Ähnliche Funktionen konnten später für murine GBP2-Proteine festgestellt werden (Carter et al., 2005). Die GBPs vermitteln zellautonome Immunität (Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016; Kravets et al., 2012; MacMicking, 2012; Meunier et al., 2015; Pilla et al., 2014) und gehören zur Dynamin-Superfamilie der GTPasen (Praefcke und McMahon, 2004). Im menschlichen Genom wurden bislang sieben hochkonservierte GBPs und ein Pseudogen identifiziert. Im Mausgenom konnten elf GBPs und zwei Pseudogene charakterisiert werden (Kresse et al., 2008; MacMicking, 2004; Olszewski et al., 2006). Vorherige Arbeiten zeigten, dass *Splice*-Varianten von humanem GBP3 eine Immunität gegen Influenza-Infektionen durch die Repression viraler Polymerase-Komplexe vermitteln (Nordmann et al., 2012). Ebenso konnte gezeigt werden, dass humanes GBP5 die Virushüllen-Entwicklung von HIV1 störend beeinflusst (Krapp et al., 2016). Die antivirale Eigenschaft des hGBP5 wurde durch die vorhandene Isoprenylierung und nicht durch eine Protein-Oligomerisation oder GTPase-Aktivität begründet (Krapp et al., 2016). Diese Forschungsarbeit behandelt die Untersuchung muriner GBPs (mGBPs). Die Genloci der mGBPs sind auf den Chromosomen 3 und 5 organisiert. Die mGBP-Proteine bestehen aus drei spezifischen Domänen. Die N-terminale GTPase (G) Domäne (~300 Aminosäuren) mit der GTP-Bindungsstelle weist vier konservierte Sequenzelemente G1 bis G4 auf. Dabei entspricht G1 der Phosphat-bindenden Sequenzeinheit, G2 einem Threonin-bindenden Motiv, G3 der Phosphat- und Magnesium-bindenden Sequenz (Magnesium gilt als Kofaktor für die Guanylat-Bindung) und G4 der nukleotidspezifischen Einheit (Boehm et al., 1998; Cheng et al., 1991; Praefcke et al., 1999). Die G2 und G3 Sequenzeinheiten sind involviert in der Konformationsänderung der G Domäne während der GTP-Hydrolyse (Praefcke und McMahon, 2004; Vopel et al., 2010; Wehner et al., 2012). Die helikale mittlere M Domäne (~150-200 Aminosäuren) besteht aus zwei Helix-Strukturen und führt zu einer gestreckten Proteinkonformation (Nantais et al., 1996). Die C-terminale E Domäne oder auch GTPase Effektor-domäne (~100 Aminosäuren) besteht aus zwei Helices ($\alpha_{12/13}$) und weist eine stabilisierende Funktion auf. Sie ist involviert in der Nukleotidbindung sowie in der Stimulation der GTPase Aktivität (Nantais et al., 1996). Die auf Chromosom 3 kodierten mGBPs lassen sich aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe, bestehend aus

mGBP1, mGBP2 und mGBP5, wird charakterisiert durch mGBPs mit einem zusätzlichen C-terminalen CaaX Motiv (Degrandi et al., 2013; Stickney und Buss, 2000). Dieses CaaX Motiv (C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure, X = terminale Reste) wird posttranslational durch eine Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Transferase modifiziert und ermöglicht eine Membraninteraktion (Cheng et al., 1991; Kravets et al., 2016; Praefcke et al., 1999; Prakash et al., 2000; Stickney und Buss, 2000). Mutationen in diesem Sequenzbereich resultieren in einer untypischen, subzellularen Verteilung dieser Proteine und führen zum vollständigen Verlust ihrer anti-pathogenen Eigenschaft (Degrandi et al., 2013; Kim et al., 2011; Kravets et al., 2012; Tietzel et al., 2009; Vestal et al., 2000). Die zweite Gruppe besteht aus mGBP3 und mGBP7. Diese Proteine besitzen keine zusätzliche CaaX-Isoprenylierungsstelle. Auf Chromosom 5 befinden sich die mGBPs 4, 6, 8, 9, 10 und 11. In früheren Studien konnte allerdings keine kodierende mRNA für mGBP4 identifiziert werden, weswegen hier von einem Pseudogen auszugehen ist (Koner mann et al., 2007).

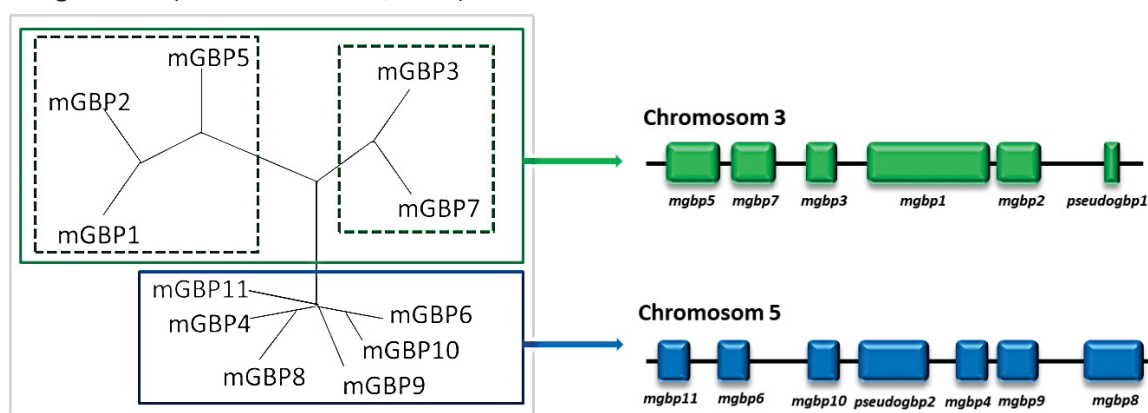


Abbildung 2: Der phylogenetische Stammbaum der murinen GBPs. Die mGBPs 1, 2 und 5 stellen eine Unterkategorie auf dem Chromosom 3 dar und besitzen eine zusätzliche Isoprenylierungsstelle. Das mGBP3 und mGBP7, welche keine Isoprenylierungsstelle besitzen, befinden sich ebenfalls auf Chromosom 3. Die mGBPs 4, 6, 8, 9, 10 und 11 befinden sich auf dem Chromosom 5 (modifiziert nach Degrandi et al., 2007).

Ein besonderes Merkmal der mGBPs ist die weitere Hydrolyse von GDP zu GMP (Kochs et al., 2010; Kravets et al., 2016; Legewie et al., 2019; Praefcke und McMahon, 2004; Tripathi et al., 2017; Wehner et al., 2012). Die Entdeckung ihrer anti-pathogenen Eigenschaft reflektiert ihre wichtige Rolle in der Abwehr gegen prokaryotische und eukaryotische Pathogene (Carter et al., 2005; Degrandi et al., 2007; Kravets et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der mGBP-Familie zu der parasitophoren Vakuole (PV) des obligaten, intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) rekrutieren und akkumulieren können (Degrandi et al., 2007). Dabei wurde den mGBPs eine Funktion bei Ruptur-Mechanismen der *T. gondii* PV-Membran (PVM) sowie bei der Kontrolle der parasitären Replikation *in vivo* zugeschrieben (Degrandi et al., 2013; Selleck et al., 2013; Yamamoto et al., 2012). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die GTPase Aktivität und Isoprenylierung der C-terminalen CaaX-Box die Rekrutierung von mGBP2 an die PVM reguliert und essentiell für die Kontrolle der *T. gondii*-Proliferation innerhalb der PV ist (Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016; Kravets et al., 2012). Kravets konnte durch *Live Cell Imaging* Studien und Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopien, *T. gondii* und die dazugehörigen Abwehrmechanismen in lebenden Zellen visualisieren. Dadurch wurde gezeigt, dass mGBP2 in

multimerischen Komplexen in Vesikel-ähnlichen Strukturen (*vesicle-like structures*, VLS) assembliert, insbesondere in Formationen aus mGBP2/mGBP2, mGBP2/mGBP1 und weniger aus mGBP2/mGBP3. Keine Assemblierung fand zwischen mGBP2 und mGBP6 statt (Kravets et al., 2016). Die VLS-Komplexe bildeten sich aus Dimeren und Multimeren in verschiedenen Zusammensetzungen und konnten nachweisbar in hohen Konzentrationen (10 -200 μm) zu der PVM von *T. gondii* rekrutieren (Kravets et al., 2016). Die Funktion der starken Kolo-kalisation zwischen mGBP2 und mGBP1 wird weiterhin analysiert. Es konnte verdeutlicht werden, dass in mGBP2-defizienten Zellen mGBP1 weiterhin zu *T. gondii* rekrutiert und entsprechend auch separat von mGBP2 an die PVM akkumuliert (Degrandi et al., 2013).

Eine Deletion der mGBPs auf dem Chromosom 3 (mGBP^{chr3-/-}) in der Maus zeigte eine gesteigerte Sensibilität gegenüber *T. gondii*-Infektionen, mit einer erhöhten Mortalitätsrate während der akuten Infektionsphase (Yamamoto et al., 2012). *In vitro* wurde eine Rekonstitution von mGBP2 in mGBP^{chr3}-defizienten Zellen durchgeführt, die keine ausreichende Kontrolle der *T. gondii*-Replikation gewährleistete. Entsprechend scheint der anti-parasitäre Effekt von mGBP2 essenziell aber nicht ausreichend gegenüber einer effektiven Abwehrkontrolle von *T. gondii* zu sein (Degrandi et al., 2013; Yamamoto et al., 2012). Die Rekonstitution von mGBP1, mGBP5 oder mGBP7 resultierten in eine effektive Kontrolle der *T. gondii*-Replikation und zeigten vergleichbare Ergebnisse zu den Wildtyp-Zellen (Yamamoto et al., 2012). Dieser Effekt resultierte in die Vermutung, dass mGBP1, mGBP5 und mGBP7 spezielle Funktionen in der *T. gondii*-Immunabwehr einnehmen und die Deletion der anderen mGBPs auf dem Chromosom 3 kompensieren (Yamamoto et al., 2012).

Des Weiteren üben mGBPs einen großen Einfluss auf Bakterien-enhaltende Vakuolen von *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila* und *Francisella spp.* aus (Kim et al., 2011; Lindenberg et al., 2017; Meunier et al., 2015; Tietzel et al., 2009). In einer Studie von Feeley et al. wird vermutet, dass eine Galectin-3-Interaktion mit mGBP2 besteht und diese Verbindung für die GBP-Rekrutierung zu der *L. pneumophila*-Vakuole notwendig ist (Feeley et al., 2017). Besonders mGBP1, mGBP7 und mGBP10 konnten an den Pathogen-enhaltenden Vakuolen von *L. monocytogenes* oder *M. bovis* detektiert werden (Kim et al., 2011).

Innerhalb der letzten Jahre wurde deutlich, dass die GBPs lokalisierend auf dem murinen Chromosom 3 als Schlüsselfaktoren für die AIM2-Aktivierung während einer *Francisella novicida*-Infektion agieren (Meunier et al., 2015). Das Inflammasom AIM2 (*absent in melanoma 2*) bindet doppelsträngige DNA und vermittelt die Detektion von Viren und Gram-negativen sowie Gram-positiven Bakterien (Briken et al., 2013; Fernandes-Alnemri et al., 2010; Kim et al., 2010; Lee et al., 2012; Rathinam et al., 2010; Sauer et al., 2010). Die Arbeitsgruppe von Petr Broz verdeutlichte die Funktionalität von mGBP2 und mGBP5 in der AIM2-Kontrolle. Die GBPs assoziieren an zytosolische *F. novicida* und aktivieren einen noch unbekanntes Lyse-Mechanismus, wodurch eine AIM2-Inflammasom Reaktion hervorgerufen wird (Meunier et al., 2015).

Caspase-11 ist ein Sensor für zytosolisches LPS. Es wird vermutet, dass durch die GBP-vermittelte Vakuolen-Lyse von *Salmonella Typhimurium* LPS freigesetzt und durch Caspase-11 detektiert wird (Meunier et al., 2014; Pilla et al., 2014). Es besteht die Theorie, dass GBP-induzierte Lysemechanismen zu einer Detektion von PAMPs durch zytosolische PRRs führen. Anhand dieser

These wird der GBP-Kontrollmechanismus für die Aktivierung kanonischer und nicht-kanonischer Inflammasome während einer Pathogen-Infektion erklärt (Man et al., 2016; Meunier und Broz, 2016).

Die zelluläre Lokalisation der mGBPs nach einer IFN γ -Stimulation gibt Hinweise auf die Rolle der Proteine bei intrazellulären Infektionen. Diese befinden sich in VLS, die nach einer Infektion eine Lokalisationsänderung aufweisen und an der PV des Parasiten akkumulieren (Degrandi et al., 2007).

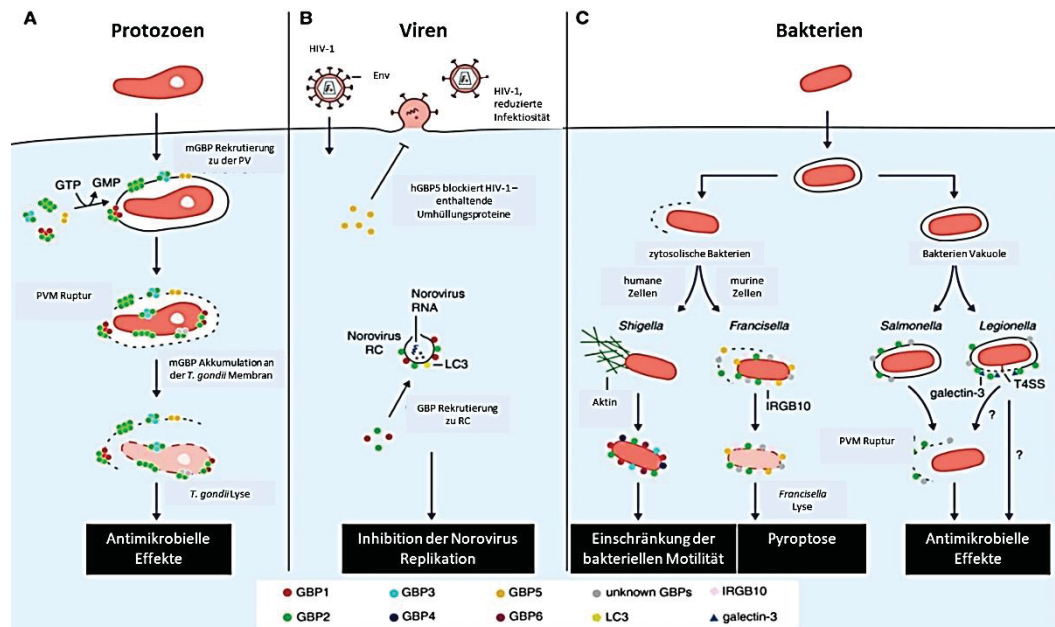


Abbildung 3: Übersicht der GBP-Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Protozoen, Viren und Bakterien. A) Eine Protozoen-Infektion durch beispielsweise *T. gondii* in einer Mauszelle führt zu der Bildung einer parasitophoren Vakuole (PV). Wirts-Proteine wie mGBP2 formen Homodimere und mit anderen mGBPs Heterodimere in VLS (*vesicle-like structures*) und assoziieren unter GTP-Verbrauch an die *T. gondii*-PV. Durch die mGBP-Akkumulation wird eine PV-Lyse herbeigeführt, mit einer nachfolgenden direkten Akkumulation einiger mGBPs an die parasitäre Plasmamembran. Diese Mechanismen führen zum Abbau des Parasiten und entsprechend zu antimikrobiellen Effekten. B) In humanen, durch HIV1-infizierten Zellen beeinträchtigt das hGBP5 die Aufnahme viraler Verpackungsproteine (Env). Dieser Effekt resultiert in einer reduzierten Infektiosität. Zusätzlich können GBP1 und GBP2 in humanen und murinen Zellen in Abhängigkeit von LC3 zu dem viralen Replikationskomplex von Noroviren rekrutieren und dadurch die virale Replikation inhibieren. C) Bakterien infizieren Zellen in membrangebundenen Kompartimenten, die entweder das Überleben der Mikroben schützen (vakuoläre Bakterien), oder, im Fall der zytosolischen Bakterien, lysiert werden. Im Zytosol humaner Zellen assembliert und polymerisiert *Shigella flexneri* Aktin-Schweife, welche die bakterielle Ausbreitung zu verschiedenen Zellen fördern. GBPs, die an zytosolischen *Shigella flexneri* assoziieren, können durch ihre Akkumulation die Aktin-Formation behindern und das Bakterium in seiner Beweglichkeit und Ausbreitung inhibieren. In murinen Zellen können die GBPs an zytosolische *Francisella novicida* akkumulieren, wodurch IRGB10 zu der Bakterienmembran rekrutiert wird und zur Lyse des Bakteriums führt. Die Freisetzung der bakteriellen DNA wird durch AIM2-Inflammasome detektiert und induziert die Wirtszell-Pyroptose. Bisher sind die genauen Mechanismen der GBP-induzierten Membran-Lyse oder die antimikrobiellen Effekte auf das bakterielle Wachstum oder auf Parasiten weiterhin unklar (modifiziert nach Santos und Broz, 2018).

1.3.1 Phänotypen von mGBP-defizienten Mäusen nach *T. gondii*-Infektionen

Neben *in vitro* Infektionsstudien mit *T. gondii* wurden zudem *in vivo* Untersuchungen mit mGBP-defizienten (mGBP^{-/-}) Mäusen durchgeführt. Basierend auf vorangegangene Ergebnisse wurden eine mGBP^{Chr3-/-} Mauslinie (Deletion aller mGBPs lokalisierend auf dem murinen Chromosom 3) (Yamamoto et al., 2012), eine mGBP1^{-/-} Mauslinie (Selleck et al., 2013), mGBP2^{-/-}

Mauslinie (Degrandi et al., 2013) und eine $mGBP7^{-/-}$ Mauslinie (von C. Beuter-Gunia in Steffens et al., akzeptiert) fokussiert und auf ihre Suszeptibilität während einer *T. gondii*-Infektion analysiert.

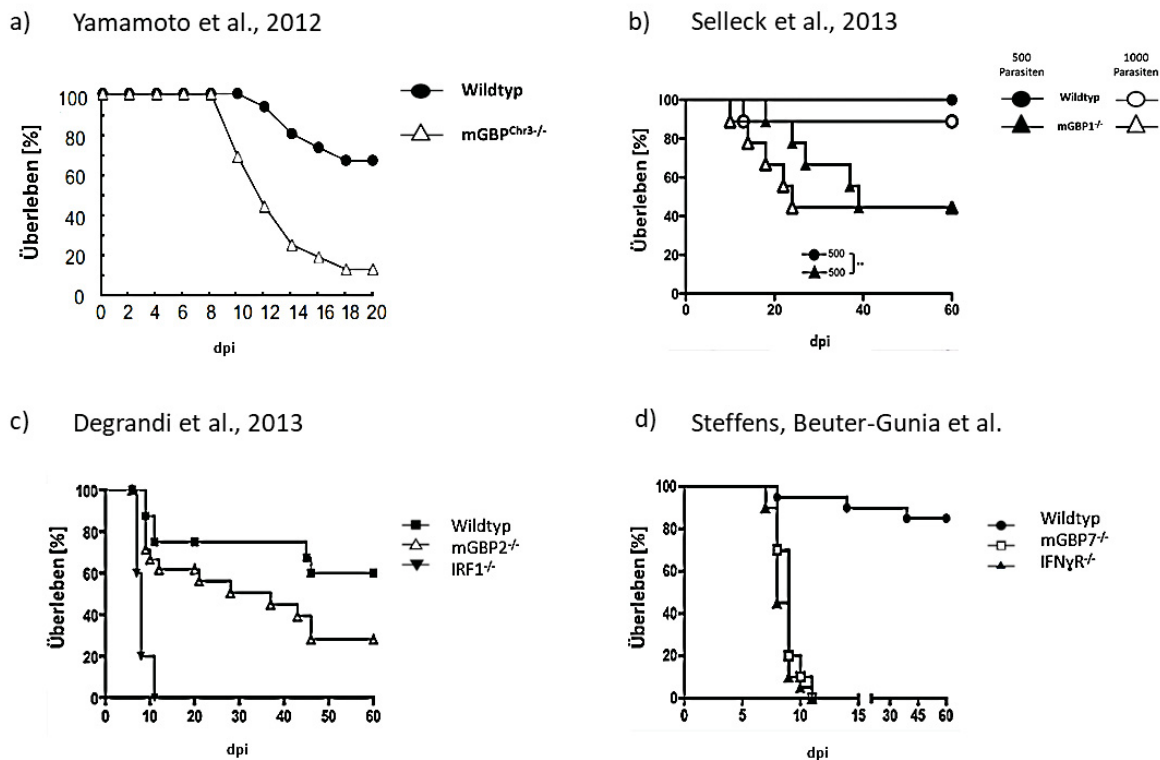


Abbildung 4: Phänotypen von mGBP-defizienten Mäusen während einer *T. gondii*-Infektion. Überlebenskurven von a) $mGBP^{Chr3^{-/-}}$ -defizienten Mäusen ($mGBP^{Chr3^{-/-}}$) (Yamamoto et al., 2012), von b) $mGBP1^{-/-}$ -defizienten Mäusen ($mGBP1^{-/-}$) (Selleck et al., 2013), von c) $mGBP2^{-/-}$ -defizienten Mäusen ($mGBP2^{-/-}$) (Degrandi et al., 2013) und d) $mGBP7^{-/-}$ -defizienten Mäusen ($mGBP7^{-/-}$) (Steffens et al., akzeptiert) nach einer *T. gondii*-Infektion (Abbildungen wurden modifiziert). Wildtyp-Mäuse (WT) zeigen keine genetischen Veränderungen, *Knockout*-Mäuse beinhalten keine Gen- und Proteinexpression der deletierten mGBPs. $IRF1^{-/-}$ sind Mäuse ohne Interferon Regulator Faktor 1 (*interferon regulatory factor 1*) und $IFN\gamma R^{-/-}$ sind Mäuse ohne Interferon- γ Rezeptor, welche in c) und d) als Kontrollen genutzt wurden. Die Anzahl der Tage nach der *T. gondii*-Infektion werden auf der X-Achse dargestellt (dpi – days post infection).

Mittels *Gene-targeting* und homologer Rekombination wurden mGBP-defiziente Mauslinien hergestellt. Diese Mauslinien und entsprechende (WT-) Kontrolltiere wurden mit dem obligat-intrazellulären Parasiten *T. gondii* infiziert. Die Untersuchungen der Überlebensrate der infizierten Mäuse mit einer Deletion aller mGBPs auf dem Chromosom 3 zeigten eine zugenommene Sensibilität gegenüber *T. gondii*-Infektionen, mit einer erhöhten Mortalitätsrate während der akuten Infektionsphase (Yamamoto et al., 2012). Die $mGBP1^{-/-}$ -defizienten Mäuse (Selleck et al., 2013) weisen eine ähnliche Suszeptibilität wie die $mGBP2^{-/-}$ -defizienten Mäuse (Degrandi et al., 2013) auf, wobei eine erhöhte Mortalitätsrate während der chronischen Infektion zu beobachten ist. Dieser Effekt in $mGBP1^{-/-}$ - und $mGBP2^{-/-}$ -defizienten Tieren während der chronischen *T. gondii*-Infektion ist vergleichbar mit bereits beschriebenen *Nos2*-defizienten Tieren, welche ein vermindertes Level an Stickstoffmonoxid (NO) produzieren (Scharton-Kersten et al., 1997). Auch wenn in den $mGBP^{Chr3^{-/-}}$ -defizienten Tieren nach einer $IFN\gamma$ -Stimulation ein normales Level an NO nachgewiesen werden konnte (Yamamoto et al., 2012), könnte die erhöhte Suszeptibilität der $mGBP1^{-/-}$ - und $mGBP2^{-/-}$ -defizienten Mäusen während der chronischen *T. gondii*-Infektion mit einer reduzierten

NO - Produktion zusammenhängen (Selleck et al., 2013). Auffällig ist der ausgeprägte Phänotyp der mGBP7^{-/-} - Mäuse mit einer vollständigen Mortalitätsrate aller Tiere binnen zehn Tagen nach der *T. gondii*-Infektion. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen die essenzielle Rolle von mGBP7 während der akuten Infektionsphase von *T. gondii*.

1.3.2 Das murine GBP7-Protein

Das mGBP7-Protein ist ein Mitglied der mGBP-Familie, welches zur Vakuolenmembran von *Chlamydia trachomatis* (Lindenberg et al., 2017), *L. monocytogenes*, *M. bovis* (Kim et al., 2011) und *T. gondii* (Degrandi et al., 2007) rekrutieren kann. Es wird vermutet, dass mGBPs zu einer Inhibierung der Pathogen-Replikation führen indem sie die PV destabilisieren und in das Vakuolenlumen penetrieren. Ein genauer Mechanismus ist derzeit nicht bekannt und es gibt keine Hinweise, ob mGBP7 direkt mit der PV-Membran interagiert, oder mittels weiterer Interaktionspartner mit den Membranen assoziiert. Vorherige Studien zeigten, dass mGBP7 die Produktion von ROS regulieren kann bedingt durch eine Interaktion mit den Untereinheiten der NADPH Oxydase 2 (Kim et al., 2011). Kürzlich wurde erstmalig eine biochemische Charakterisierung von mGBP7 durchgeführt (Legewie et al., 2019). Das mGBP7-Protein ist mit 638 Aminosäuren das größte Mitglied der p65 mGBP-Familie. Es besitzt keine Isoprenylierungsstelle, die eine Membranverankerung ermöglichen könnte. Dieser Punkt unterscheidet mGBP7 von mGBP2, ein bereits gründlich untersuchtes Mitglied der mGBPs und das nächste murine Ortholog zum humanen GBP1. Ein weiterer leichter Unterschied zu mGBP2 konnte auch für die GTP-Affinität und GTP-Hydrolyse nachgewiesen werden (Legewie et al., 2019). Anhand von GTP-Bindungsaffinitätsanalysen wurde gezeigt, dass mGBP7 im Vergleich zu mGBP2 eine zweifach erhöhte Affinität zu GTP aufweist. Des Weiteren konnte eine fünffache Erhöhung der GTP-Affinität im Vergleich zum humanen GBP1 festgestellt werden (Kravets et al., 2012; Kunzelmann et al., 2005; Praefcke et al., 1999; Praefcke und McMahon, 2004). Die Ursache könnte eine Aminosäuren-Variation im G4-Sequenzbereich bei der mGBP7 G Domäne sein (Abschnitt 1.3). Diesbezüglich gibt es jedoch bislang keine genauen Kenntnisse. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Nukleotidbindung stellt die 51. Aminosäuren-Position in der G Domäne dar. Punktmutationen des Lysins (K) zu einem Alanin (A) bei hGBP1 oder mGBP2, reduzierten die GTP-Bindung (bei hGBP1 50-fach reduziert, bei mGBP2 ungefähr 100-fach reduziert) (Kravets et al., 2012; Legewie et al., 2019; Praefcke und McMahon, 2004). Die Reduktion der GTP-Bindungsaffinität im Falle der mGBP7-K51A-Mutante konnte ebenfalls festgestellt werden (Legewie et al., 2019). Für hGBP1 findet die GTP-Hydrolyse durch zwei konsekutive Abspaltungen einzelner Phosphatgruppen und nicht durch die Abspaltung eines einzigen Pyrophosphates statt (Schwemmle und Staeheli, 1994). Demnach wurde vermutet, dass nicht nur das humane GBP1 mit einer GMP-Produktion von 85 – 90 % und das murine GBP2 mit 74 %, sondern auch mGBP7 das Guanylatprodukt GMP als Endprodukt mit hoher Umsatzmenge freisetzen kann (Kravets et al., 2012; Praefcke und McMahon, 2004; Vestal und Jeyaratnam, 2011). Diese Hypothese konnte kürzlich experimentell verifiziert werden. Zudem wurde beobachtet, dass mGBP7 während der GTP-Hydrolyse ein transientes Dimer bildet (Legewie et al., 2019).

1.4. Der obligate, intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii*

Der weltweit vorkommende, intrazellulär replizierende Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) gehört zur Gruppe der einzelligen, eukaryotischen Protozoen. Im spezifischen wird er zu den Apicomplexa, den Parasiten mit einem Apicoplasten gezählt. Die *T. gondii*-Morphologie besteht aus einem Mikrotubuli-organisierendem Zentrum und speziellen sekretorischen Elementen, die für eine Zellinvasion und den Aufbau der schützenden parasitophoren Vakuole (PV) notwendig sind (Hunter und Sibley, 2012). Schon im Jahre 1908 wurde der Parasit aus dem nordafrikanischen Nager *Ctenodyctylus gundii* von Nicolle und Manceaus isoliert. Bei einer kongenitalen Toxoplasmose - Infektion eines Kindes, konnte *T. gondii* erstmals als menschlicher Krankheitserreger im Jahre 1939 von Wolf beschrieben werden (Wolf et al., 1939). Das *T. gondii*-Genom ist circa 87 Mb groß und verteilt sich auf 14 Chromosomen (Reid et al., 2012). Zusätzlich gibt es ein mitochondriales Genom mit 6 kb und ein 35 kb episomales plastidenähnliches Genom, den Apicoplasten (Kissinger et al., 2003). Der Apicoplast wurde bislang in mehreren Vertretern der Apicomplexa nachgewiesen und ist ein charakteristisches Merkmal dieser Familie (Ajioka et al., 2001; Kohler et al., 1997). Aufgrund der Homologie zu photosynthetischen Plastiden wird vermutet, dass in Apicoplasten die Synthese von aromatischen Amino- und Fettsäuren stattfindet (Fichera und Roos, 1997; Kohler et al., 1997; Roberts et al., 1998). Anhand der Homologie und der Ergebnisse phylogenetischer Untersuchungen, scheinen die Apicoplasten durch eine sekundäre Endosymbiose einer Grün- oder Rotalge als Symbionten entstanden zu sein (Kohler et al., 1997).

Durch ein breites Wirtsspektrum und der Fähigkeit, nahezu alle warmblütigen Vertebraten zu infizieren, ist *T. gondii* zu einem der meist verbreiteten Parasiten der Welt geworden. Drei charakterisierte Toxoplasma-Linien können bislang zwischen den in Europa und Nordamerika verbreiteten Parasiten unterschieden werden. Diese weisen zwar starke phänotypische und genetische Übereinstimmungen auf, unterscheiden sich allerdings in etwa 1 % ihres Genoms (Darde et al., 1992; Howe und Sibley, 1995; Sibley, 2009). Die Toxoplasma-Typen I bis III werden anhand ihrer charakteristischen Virulenz eingeteilt. Parasiten des Typ I-Stammes, beispielsweise der BK-Stamm, gelten als höchst virulent im Mausmodell und bewirken mit weniger als 10 Parasiten eine vollständige Letalität. Sie bilden nur selten Zysten aus. Typ II-Parasiten, beispielsweise ME49-Toxoplasmen, sind die Hauptverursacher von humanen Infektionen, die zum Beispiel eine chronische Toxoplasmose zur Folge haben können (Sibley, 2009; Sibley und Howe, 1996). Im Mausmodell zeigen sie eine geringere Virulenz im Vergleich zu Typ I-Parasiten und können Gewebszysten ausbilden (Araujo und Slifer, 2003; Barragan und Sibley, 2003; Boothroyd und Grigg, 2002; Saeij et al., 2005). Die Typ III-Parasiten sind durch eine geringe Virulenz charakterisiert und werden nur selten in klinischen Isolaten, vorzugsweise in infizierten Tieren, gefunden (Sibley und Howe, 1996).

Es wird angenommen, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert ist, davon etwa 30 – 50 % chronisch. Zudem schätzt die Weltgesundheitsorganisation WHO, dass in Europa etwa 20 % der Krankheitslast der durch Lebensmittel übertragenen Krankheiten durch *T. gondii*-Infektionen bedingt sind (Havelaar et al., 2010; Montoya und Liesenfeld, 2004; Torgerson und Mastroiacovo, 2013). Die meisten Infektionen bei Menschen mit einem intakten Immunsystem verlaufen asymptomatisch oder

zeigen grippeähnliche Anzeichen, wodurch die genaue Zahl aller Infektionen schwierig zu bestimmen ist. Die Anzahl immunsupprimierter Menschen, zum Beispiel AIDS-Patienten, hat allerdings global zugenommen. Diese können durch eine *T. gondii*-Infektion an schwerwiegenden Krankheitsbildern erkranken (beispielsweise an einer Toxoplasmose-Enzephalitis) und versterben (Kim und Weiss, 2004). Besonders gefährlich ist eine erstmalige Infektion während einer Schwangerschaft. Dabei kann es zu einer kongenitalen Parasitenübertragung über die Plazenta der Mutter zum Fötus kommen. Diese transplazentare Übertragung führt in den meisten Fällen zu schweren Missbildungen und besonders häufig zu Fehl- und Totgeburten des Kindes (Kim und Weiss, 2008; Luft und Remington, 1992). Aufgrund der beschriebenen Folgen einer *T. gondii*-Infektion hat die Forschung an diesem Parasiten in den letzten Jahren an klinischer Bedeutung gewonnen.

1.4.1 Der Lebenszyklus von *T. gondii*

Die zur Gattung der Apicomplexa-gehörenden Parasiten weisen einen komplexen Lebenszyklus auf, welcher vollständig erst 1970 beschrieben werden konnte (Frenkel et al., 1970). *T. gondii* differenziert innerhalb seines Lebenszyklus in drei unterschiedliche Stadien. Die Tachyzoiten sind eines dieser Entwicklungsstadien. Sie treten während der akuten Infektionsphase auf und zeigen eine hohe Replikationsrate ungeschlechtlich in der parasitophoren Vakuole durch Längenteilung (Endodyogenie) innerhalb von fünf bis neun Stunden. Nach einigen Tagen reißt die Wirtszelle auf und die Parasiten werden freigesetzt. So können sie neue Zellen infizieren und sich in viele Organsysteme ausbreiten (Frenkel, 1988). Nach der akuten, Tachyzoiten-vermittelten Infektionsphase, erfolgt unter dem Druck der Immunantwort die Differenzierung zu Bradyzoiten, einem weiteren Entwicklungsstadium. Diese können sich einer spezifischen Immunreaktion des Wirtes entziehen, indem die PV zu einer Zystenhülle modifiziert wird (Dubey et al., 1998; Ferguson und Hutchison, 1987). Innerhalb dieser Zyste vermehren sich die Bradyzoiten ebenfalls durch Endodyogenie, allerdings mit einer sehr reduzierten Replikationsrate. Dies charakterisiert die chronische Infektionsphase. Während dieses Ruhestadiums ist es den Parasiten möglich, innerhalb der Zysten für die vollständige Lebensdauer ihres Wirtes zu persistieren, ohne dabei Krankheitssymptome hervorzurufen (Bohne et al., 1999). Die Bradyzoiten-Zysten sind hauptsächlich im zentralen Nervensystem, im Muskelgewebe oder in der Retina vorzufinden (Dubey et al., 1998). Werden derartige Zysten oral durch infizierte Lebensmittel aufgenommen, wird die Zystenhülle bedingt durch enzymatische Faktoren und dem sauren Milieu im Magen abgebaut. Die Bradyzoiten sind resistent gegen Säure und Pepsin und können so den Magen passieren und Dünndarm-Epithelzellen infizieren. Innerhalb dieser Zellen differenzieren die Parasiten zu Tachyzoiten und lösen eine erneute, akute Infektionsphase mit nachfolgender chronischer Infektionsphase aus (Jacobs, 1957; Pettersen, 1979). Tachyzoiten und Bradyzoiten unterscheiden sich phänotypisch nur geringfügig, können aber durch eine Stadien-spezifische Expression von SAG1 (Tachyzoiten) oder BAG1 (Bradyzoiten) unterschieden werden. Im Allgemeinen beinhaltet der Apikalkomplex drei umgebende Membranen (Pellikel), wobei die Plasmamembran den inneren Komplex ausbildet und einem Membrankomplex bestehend aus einer inneren und äußeren Membran, unterliegt. Das Konoid ist eine Struktur aus spiralförmigen Tubulinpolymeren und für die rotierende Fortbewegung der Toxoplasmen verantwortlich (Hu et al.,

2002). Ebenfalls charakteristische sekretorische Organellen sind die Mikronemen und die Rhoptrien. Die Rhoptrien-Konformation, in Tachyzoiten meist keulenförmig und in Bradyzoiten häufig schleifenförmig, verursacht eine geringfügig schmalere Form der Tachyzoiten (Dubey et al., 1998) (genauere Informationen zum *T. gondii*-Aufbau sind aus Abbildung 6 zu entnehmen). Diese beiden *T. gondii*-Stadien können in allen warmblütigen Vertebraten, die als Zwischenwirte agieren, nachgewiesen werden (Dubey et al., 1998; Jones und Dubey, 2012; Lindsay et al., 1991; Su et al., 2003). Das dritte *T. gondii*-Stadium ist der Sporozoit im Endwirt. Als definitiv beschriebener Endwirt gelten Mitglieder der *Felidae*, das heißt die Mitglieder der katzenartigen Tiere (Dubey et al., 1998; Lindsay et al., 1991).

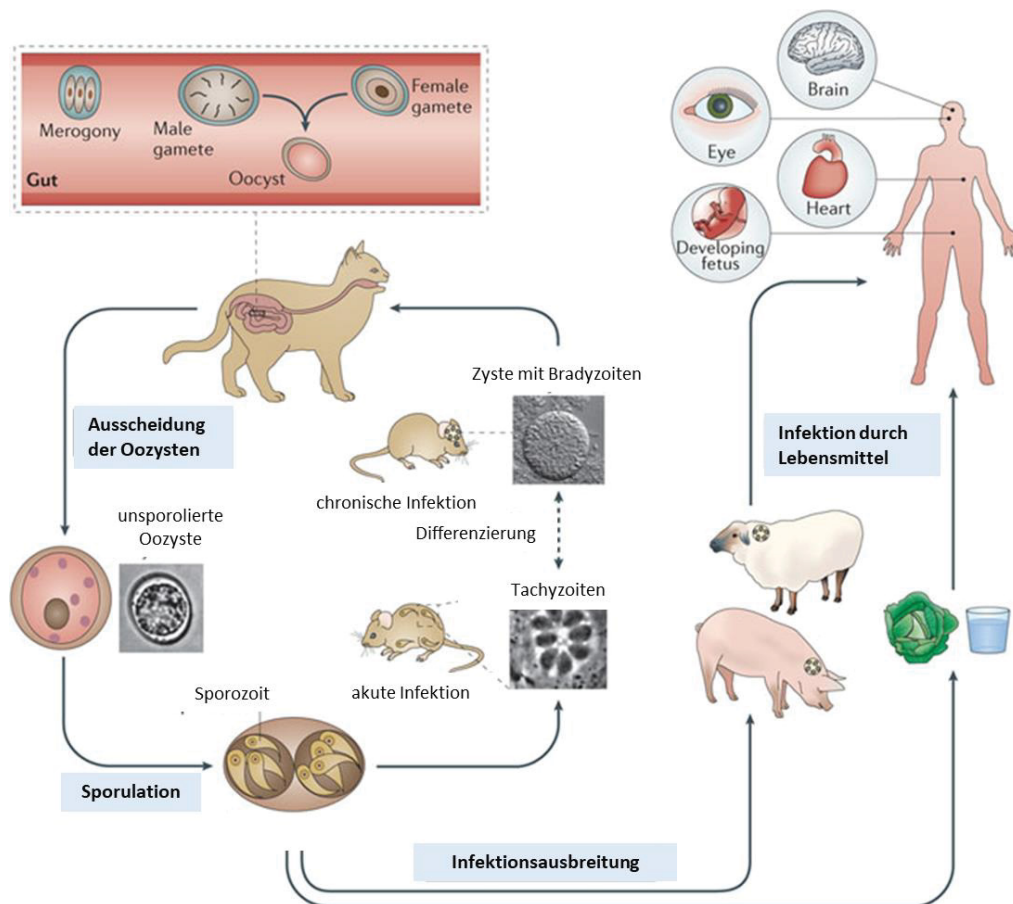


Abbildung 5: Der Lebenszyklus von *T. gondii* (teilweise modifiziert nach Hunter und Sibley, 2012). Bei einer Infektion einer Katze findet ein sexueller Vermehrungszyklus von *T. gondii* innerhalb des Darms (*Gut*) mit weiblichen und männlichen Gameten (*male and female gametes*) statt. Es bildet sich eine Oozyste, welche ausgeschieden wird und durch eine Sporulation ausreift. Die Sporozoit werden von Zwischenwirten aufgenommen und differenzieren sich dort zu Tachyzoiten während der akuten Infektionsphase. Es folgt die chronische Infektion und die Ausbildung von Bradyzoiten in speziellen Zysten. Diese können dann erneut aufgenommen werden und zu Infektionen führen. Die Hauptinfektionsursache beim Menschen ist die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel (nicht ausreichend gegartes Fleisch, ungewaschenes Obst und Gemüse, kontaminiertes Trinkwasser). Die aufgenommenen Parasiten können sich in verschiedenen Gewebstypen (Gehirn (*Brain*), Auge (*Eye*) oder Herzen (*Heart*)) ausbreiten und durch eine transplazentare Übertragung einen Fötus infizieren.

Wenn eine Katze mit *T. gondii* infiziert wird, verläuft die Infektion anfänglich wie bei den Zwischenwirten. Die mit Bradyzoiten gefüllte Zyste löst sich im Magen der Katze vollständig auf. Die Bradyzoiten werden freigesetzt und infizieren Zellen des Dünndarmepithels. Anschließend verändert

sich der Vermehrungszyklus und es entwickeln sich sowohl weibliche als auch männliche Gametozyten im intestinalen Epithelium mit der Einleitung der sexuellen Vermehrung (Dubey, 1992). Die Gametozyten verschmelzen miteinander und bilden eine nicht infektiöse Oozyste (Freyre et al., 1989). Die infizierten Epithelzellen platzen auf und entlassen die Oozyste ins Darmlumen, wo sie mit den Faeces der Katze ausgeschieden wird. In der freien Umwelt finden die meiotischen Teilungsprozesse statt. Diese Sporulation erfolgt innerhalb von fünf bis acht Tagen und endet mit der Bildung acht haploider Sporozoiten. Die Sporozoiten können über die Aufnahme kontaminierter Nahrung (rohes Fleisch, ungewaschenes Obst und Gemüse), Flüssigkeit oder Erde, oder durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren, von warmblütigen Vertebraten als Zwischenwirt aufgenommen werden. Es folgt der asexuelle Vermehrungszyklus mit einer Differenzierung der Sporozoiten zu Tachyzoiten in der PV und nachfolgend zu Bradyzoiten in Zysten. Sobald eine Zyste wieder von einem Katzenartigen aufgenommen wird, findet erneut die sexuelle Vermehrung mit der Ausbildung von Oozysten statt und der Infektionszyklus schließt sich (Black und Boothroyd, 2000; Dubey, 1997; Dubey et al., 1998; Weiss und Kim, 2000).

1.4.2 Die Wirtsinteraktion von *T. gondii* und die Ausbildung einer parasitophoren Vakuole

Die Invasion von *T. gondii* in eine Wirtszelle ist ein aktiver, vom Parasiten gesteuerter Prozess und unabhängig von der phagozytotischen Eigenschaft der Wirtszelle (Dobrowolski und Sibley, 1996; Dubremetz, 1998). Diese Zellinvasion kann in jeder kernhaltigen Zelle des Wirtes stattfinden. Dabei unterliegt der Erstkontakt des Parasiten zu der Zelle einem noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus. Es wird vermutet, dass *T. gondii* mit Hilfe GPI-verankerter Moleküle an glykosylierten Rezeptoren auf der Wirtszellmembran interagiert (Fourmaux et al., 1996; Mineo et al., 1993; Ortega-Barria und Boothroyd, 1999). Diese Theorie wurde durch die Entdeckung des Mikronemen-Proteins MIC1 verstärkt, welches mit Lektin interagieren kann (Lourenco et al., 2001). Es folgt eine Anheftung an die Wirtszelle und die Reorientierung des Parasiten. Das Oberflächenmolekül SAG2 scheint für die Mobilität und Lokalisation des Parasiten unter anderem verantwortlich zu sein (Grimwood und Smith, 1995; Smith, 1995). Die lokal begrenzte Kontaktausbildung entsteht durch *tight junctions* (Michel et al., 1980) und *moving junctions* (Lovett et al., 2002), was zu einer Einstülpung der Wirtsmembran führt und sich daraufhin eine parasitophore Vakuole (PV) um den Parasiten ausbildet. Dieser Invasionsprozess dauert ungefähr zehn Sekunden (Carruthers und Sibley, 1999; Sibley und Andrews, 2000; Smith, 1995) und endet mit einem infizierenden, durch die PV-geschützten Tachyzoiten. Die PV wird aus der Plasmamembran der Wirtszelle gebildet und während der Invasion selektiv von assoziierten Wirts-Oberflächenmolekülen befreit (Suss-Toby et al., 1996). Bei einer Zellinfektion durch Bradyzoiten konnte weder eine Bildung von *tight junctions*, noch die Abspaltung assoziierter Oberflächenmoleküle dokumentiert werden. Stattdessen wurde von fingerähnlichen Auswüchsen an der Wirtszelloberfläche berichtet, die entlang der Parasitenmembran angeordnet waren (Sasono und Smith, 1998; Speer et al., 1995). Die PV wurde 1964 von Dubuy beschrieben (Dubuy et al., 1964). Die bereits benannten Proteine der Mikronemen (MIC Proteine) spielen bei der Parasiten-Invasion eine wichtige Rolle. Neben der Interaktion von MIC1 mit Lektin (Lourenco et al., 2001), konnte ebenfalls eine regulatorische Aufgabe bei der gerichteten Parasiten-Adhäsion

nachgewiesen werden (Lovett et al., 2002). Zudem sind die MIC Proteine Bestandteil einer sekretorischen Fortbewegung über kurze Distanzen, welche für die Infektion benachbarter Zellen notwendig ist (Sibley et al., 1998). Noch während des Invasionsprozesses sekretieren die Rhoptrien-Organellen ihre Proteine in das Lumen der PV. Es konnten bislang 29 Rhoptrien-Proteine nachgewiesen werden, von denen 24 als *Rhoptry bulb* Proteine (ROP) und fünf als *Rhoptry neck* (RON) beschrieben wurden (Boothroyd und Dubremetz, 2008). Eine Vielzahl der ROP Proteine sind homolog zu Kinasen (El Hajj et al., 2006). Es besteht allerdings die Vermutung, dass die meisten ROP Proteine eine Pseudokinasen-Aktivität aufweisen und letztendlich andere, teilweise noch unbekannte Funktionen besitzen (Carey et al., 2004). Den ROP Proteinen wird eine stabilisierende und strukturelle Funktion beim Aufbau der PV zugeschrieben (Behnke et al., 2011). Für das PV-lokalisierte ROP2-Protein konnte beispielsweise eine regulatorische Funktion in der dichten Anlagerung von Mitochondrien der Wirtszelle an die Außenseite der PV nachgewiesen werden (Saffer et al., 1992; Sinai und Joiner, 2001; Sinai et al., 1997). ROP18 wird eine Serin-Theronin-Kinase Aktivität zugeschrieben und es phosphoryliert Proteine im Wirtszytosol (El Hajj et al., 2006; Fentress und Sibley, 2011; Molestina et al., 2003). ROP16 beeinflusst die Genexpression der Wirtszelle (Bradley et al., 2005). Trotz der bislang nur unvollständigen Aufklärung der Funktion von ROP Proteinen ist ihre Bedeutung bei der PV-Bildung von *T. gondii* ersichtlich. Zudem sind sie beeinflussende Faktoren der parasitären Virulenz (Saeij et al., 2005; Taylor et al., 2006). Die spezifischen Proteine der Mikroneme und der Rhoptrien werden nur während der Invasion in eine Wirtszelle sekretiert. Die Proteine der dichten Granula werden nach der Zellinvasion über den gesamten Zeitraum in das PV-Lumen sezerniert (Dubremetz et al., 1993; Leriche und Dubremetz, 1990). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Sekretion der GRA Proteine (Granula-Proteine), der Mikronemen und der Rhoptrien einen Kalzium-abhängigen Mechanismus darstellen (Carruthers und Sibley, 1999; Saffer und Schwartzman, 1991). Die zu den *Excreted-Secreted Antigens* (ESAs) zählenden GRA Proteine sind beteiligt an der Ausbildung eines intravakulären Netzwerkes, welches an der Modifizierung und Organisation der PV-Membran beteiligt ist (Achbarou et al., 1991; Cesbron-Delauw, 1994; Mercier et al., 2002). Da sowohl in Tachyzoiten als auch in Bradyzoiten eine konstante GRA-Protein-Ausschüttung stattfindet, wurde diese genauer auf Unterschiede analysiert. Auffällig war die Lokalisation der GRA Proteine innerhalb der Bradyzoiten. Diese befanden sich teilweise adhärent an der Zystenwand. Deswegen wurden sie in Verbindung mit Differenzierungsprozessen und dem Aufbau der Zystenmatrix der Parasiten gebracht (Ferguson et al., 1999; Torpier et al., 1993). Im Allgemeinen scheinen die GRA Proteine bedeutend für den Nährstofftransport, für den Stoffwechsel, für den Ausbau eines intravakulären Netzwerkes tubulärer Membranen und für die Differenzierung und Modifizierung der *T. gondii*-PV zu sein (Achbarou et al., 1991; Cesbron-Delauw, 1994; Mercier et al., 2002; Sibley et al., 1994). Zudem konnte ein weiteres, sich in der dichten Granula-befindliches Protein beschrieben werden, die NTPase. Es soll an der Degradierung von ATP und bei der Aufnahme von Purinen aus der Wirtszelle beteiligt sein (Asai et al., 1995; Bermudes et al., 1994). Trotz der Möglichkeit *de novo* Pyrimidine zu synthetisieren, ist *T. gondii* auxotroph gegenüber Purinen, Zucker und ATP und deswegen auf die Aufnahme dieser Moleküle über NTPasen und durch die PV-Membran angewiesen. Diese ist für kleine Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 1,3 kDa permeabel (Schwab et al.,

1994; Schwartzman und Pfefferkorn, 1982). Durch das Fehlen von Wirtszell-Proteinen und durch die Aktivierung spezifischer Abwehrmechanismen der Toxoplasmen, sind eine Ansäuerung der PV-Vakuole und der nachfolgende Abbau der Toxoplasmen nicht möglich (Joiner et al., 1990; Jones und Hirsch, 1972; Sibley et al., 1985). Diese parasitären Schutzmechanismen lassen auf eine Manipulation und Modulation wirtszellspezifischer Signalkaskaden schließen. Ein spezifisches Charakteristikum ist zum Beispiel die Lokalisation der Wirtsorganellen wie des Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien. Dieser Prozess wird durch die wirtseigenen Mikrotubuli gesteuert und führt zu einer engen Assoziation der Organellen um die *T. gondii*-PV (Jones und Hirsch, 1972; Sinai et al., 1997). Diese Organellen fördern den metabolischen Austausch mit den Parasiten. Sie substituieren Nährstoffe, Lipide und Energieträger (Boyle und Radke, 2009; Schwab et al., 1994; Schwartzman und Pfefferkorn, 1982) mit Hilfe der Wirtsmikrotubuli und Endolysomen (Coppens et al., 2006). Ein weiterer durch *T. gondii* ausgelöster Mechanismus ist die Veränderung des Wirtszytoskeletts durch sekretierte ROP Proteine oder Toxofilin. Diese interagieren mit dem Aktinnetzwerk und führen somit die Entwicklung der PV herbei (Delorme-Walker et al., 2012). Zusammenfassend ist die Bildung der PV und damit die Bildung des wertvollsten Schutzmechanismus für *T. gondii* ein Resultat vieler Manipulations- und Modifizierungsschritte in der Wirtszelle. Dennoch interagieren Wirt und Parasit, indem ein substituierender Austausch von Nährstoffen und Lipiden stattfindet. Die genaue Lipidzusammensetzung der schützenden PV ist derweil noch unklar. Allerdings ist bereits bekannt, dass *T. gondii* Glycerophospholipide der Wirtszelle für die eigene Phospholipid-Synthese und für den Aufbau der PV-Membran verwendet (Charron und Sibley, 2002).

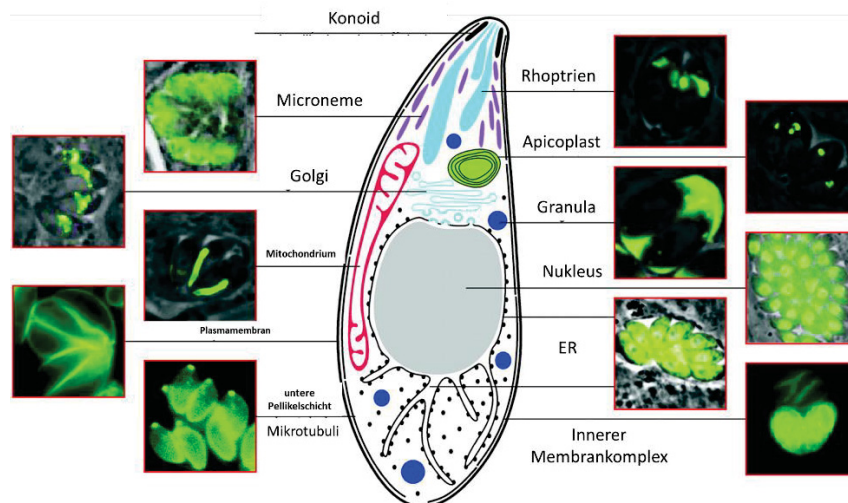


Abbildung 6: Der Aufbau von *T. gondii* (mit Fluoreszenz-markierten Kompartimenten). *T. gondii* wurde mit GFP-, YFP-, oder anderen Reporterproteinen markiert (in der Abbildung grün dargestellt) und mit einem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht, um subzelluläre Kompartimente darzustellen (modifiziert nach (Hager et al., 1999; Hu et al., 2002; Hu et al., 2001; Joiner und Roos, 2002; Radke et al., 2001; Striepen et al., 2000; Striepen et al., 1998; Striepen et al., 2001; Swedlow et al., 2002)).

1.4.3 Die Aktivierung des Immunsystems während einer *T. gondii*-Infektion

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, besitzt *T. gondii* angepasste Manipulations- und Modulationsmechanismen gegenüber der Wirtszelle, um sich gegen das wirtsspezifische Immunsystem und seinem vollständigen Abbau zu schützen. Dennoch kann ein intaktes Immunsystem eine Ausbreitung des Parasiten und einen schwerwiegenden Krankheitsverlauf verhindern. Dafür ist die Entwicklung einer zellulären Immunreaktion mit der Beteiligung des

angeborenen und erworbenen Immunsystems von größter Wichtigkeit. Das Zytokin Interferon- γ (IFN γ) spielt dabei eine entscheidende Rolle und gilt als bedeutendstes Zytokin.

Durch eine *T. gondii*-Infektion wird das angeborene Immunsystem aktiviert und eine anti-parasitäre Immunantwort ausgelöst. Diese ist gekennzeichnet durch die Produktion von IL-12 durch Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und neutrophile Granulozyten. IL-12 aktiviert NK-Zellen und T-Zellen für eine IFN γ -Produktion (Gazzinelli et al., 1993; Hunter et al., 1994; Johnson, 1992; Kahne und Ansorge, 1994). Anhand infizierter SCID-Mäuse (*severe combined immune deficiency*), welche keine T- und B- Zellen ausbilden können, konnte eine T-Zell unabhängige Immunreaktion gegen *T. gondii* festgestellt werden (Beaman et al., 1994). Dieser Effekt und die IFN γ -Produktion durch NK-Zellen hält allerdings nur der akuten Infektionsphase stand und führt ausschließlich zu einer frühen Kontrolle der Infektion. In der chronischen Phase der Infektion sind T-Zellen notwendig für das Überleben der infizierten SCID-Mäuse. Diese starben innerhalb von 20 Tagen nach der Infektion, wenn ihnen zuvor nicht noch zusätzlich T-Zellen transfundiert worden sind (Beaman et al., 1994). Weitere Forschungen ergaben, dass nicht nur in der akuten, sondern auch in der chronischen Phase sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen notwendige IFN γ -Produzenten sind, um die Infektion zu kontrollieren (Gazzinelli et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992).

Das Schlüsselzytokin IL-12 wird in Abhängigkeit von CCR5- und TLR-Signalen synthetisiert (Aliberti et al., 2003; LaRosa et al., 2008; Scanga et al., 2002; Yarovinsky et al., 2005). Der Chemokinrezeptor CCR5 wird unter anderem auf der Zelloberfläche von DCs und Makrophagen exprimiert. Einen möglichen CCR5-Liganden stellt das Toxoplasma Protein Cyklophilin-18 (C18) dar. CCR5-defiziente Mäuse zeigen eine hohe Suszeptibilität gegenüber einer *T. gondii*-Infektion und eine Beeinträchtigung der IL-12-Produktion durch DCs (Aliberti et al., 2000; Aliberti et al., 2003). Neben den CCR5-Rezeptoren scheinen besonders wichtig die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) für die Erkennung von *T. gondii* zu sein (LaRosa et al., 2008). Das TLR-Adapterprotein MyD88 löst dabei eine Signalweiterleitung sowohl von TLR als auch anderer Rezeptoren wie dem IL-1R und IL-18R aus (Burns et al., 1998; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997). Untersuchungen an MyD88-defizienten Mäusen zeigen ebenfalls eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *T. gondii*-Infektionen (Adachi et al., 1998; Cai et al., 2000; Chang et al., 1990; LaRosa et al., 2008; Mordue et al., 2001). Als weitere TLR-Liganden konnten das *T. gondii*-Protein Profilin für TLR11 und TLR12 als auch HSP70 und GPI-verankerte Proteine für TLR2 und TLR4 identifiziert werden (Debierre-Grockiego et al., 2007; Koblansky et al., 2013; Mun et al., 2005; Yarovinsky et al., 2005). Neben der IL-12 induzierten Produktion von IFN γ wird ebenfalls TNF α synthetisiert. Gleichzeitig induziert IL-12 die T-Zell Differenzierung zu CD4⁺ T_H1-Zellen, welche ebenfalls IFN γ und TNF α nach Antigenstimulation sekretieren (Trinchieri, 1995). IFN γ ist der wichtigste Vermittler bei der Immunabwehr gegen *T. gondii*. Die Bedeutung von IFN γ konnte anhand von IFN γ R-defizienten, *T. gondii*-infizierten Mäusen gezeigt werden, die hohe Mortalitätsraten aufweisen (Deckert-Schluter et al., 1996; Degrandi et al., 2007; Scharon-Kersten et al., 1996). Wie bereits in 1.2. erwähnt, führt die IFN γ -Bindung an seinen spezifischen Rezeptor und der weiterführenden Signalkaskade mittels JAK- und STAT-Proteine zu einer Aktivierung verschiedener Effektormechanismen, die elementar für die Bekämpfung von *T. gondii* sind. Durch die sequenzspezifische Transkription der GAS, können IFN γ -induzierte GTPasen,

iNOS und IDO exprimiert werden (Collazo et al., 2001; Degrandi et al., 2007; Pfefferkorn, 1984; Scharon-Kersten et al., 1997). Diese Faktoren inhibieren das parasitäre Wachstum. Die genauen Mechanismen und Interaktionskaskaden sind allerdings noch unklar.

Im Falle einer chronischen Infektion sind IL-12 produzierende Zellen vor allem an den Entzündungsherden im Gehirn vorzufinden (Fischer et al., 2000). Dort wird eine IL-12-vermittelte T-Zell-Abwehrreaktion, mit einer nachfolgenden IFN γ -Produktion, eingeleitet (Yan et al., 2000). Die NK-Zellen als IFN γ -Produzenten erscheinen im Laufe der chronischen Infektion kaum beteiligt zu sein (Kang und Suzuki, 2001). Trotz der vielen Abwehrmechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems können immunsupprimierte Patienten wegen der dann fehlenden Immunreaktionen schwer an einer *T. gondii*-Infektion erkranken. Der Parasit breitet sich in viele verschiedene Organe aus (Abbildung 5) und entwickelt neben der schützenden PV weitere Abwehrmechanismen gegen den immunologischen Druck. Beispielsweise die Inhibierung der STAT1-abhängigen Transkription von IFN γ -induzierten Effektorproteinen, indem *T. gondii* STAT1-Suppressoren (SOCS Proteine – *suppressor of cytokine signaling*) hochreguliert werden. Dadurch wird die notwendige Dimerisierung der STAT-Moleküle als auch eine Phosphorylierung und damit vorhandene Aktivierung verhindert (Schneider et al., 2013). Zudem kann es zu einer Aktivierung von STAT3-Molekülen kommen, welche eine IL-12 Synthese unterdrücken können (Butcher et al., 2005) und zu einer Inhibition von NF κ B in murinen Makrophagen führen (Butcher et al., 2001; Shapira et al., 2002).

Zusammenfassend führt die Infektion von *T. gondii* zu einer Auslösung verschiedener immunregulatorischer Mechanismen des zellulären Immunsystems. Sie alle bewirken die Inhibition der *T. gondii*-Replikation und verhindern einen Krankheitsausbruch. Im Gegenzug können diese Mechanismen insbesondere bei Infektionen von immunsupprimierten Patienten durch *T. gondii* umgangen werden, indem parasitäre Schutzmechanismen wie die Ausbildung einer schützenden PV oder Zyste sowie die Blockierung des STAT1-Signalweges induziert werden. Dies kann zum Ausbruch einer akuten und chronischen Toxoplasmose mit teilweise schweren Folgen führen.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Invasion des obligat-intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist ein aktiver, vom Parasiten gesteuerter Prozess und beinhaltet die Ausbildung einer schützenden parasitophoren Vakuole (PV) (Dobrowolski und Sibley, 1996; Dubremetz, 1998; Dubuy et al., 1964). Im subzellulären membranösen Kompartiment PV erfolgt die Vermehrung der Tachyzoiten-Form von *T. gondii*. Die PVs treten während der akuten Infektionsphase auf und sind durch eine hohe, ungeschlechtliche Replikationsrate durch Längenteilung charakterisiert. Nach einigen Tagen reißt die PV und die Wirtszelle auf und die Parasiten werden freigesetzt. So können diese neue Zellen infizieren und sich in viele Organsysteme ausbreiten und zu Bradyzoiten differenzieren (Frenkel, 1988). Diese können sich einer spezifischen Immunreaktion des Wirtes entziehen, indem die PV zu einer Zystenhülle modifiziert und die chronische Infektionsphase eingeleitet wird (Dubey et al., 1998; Ferguson und Hutchison, 1987).

Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der mGBP-Familie (murine Guanylat-bindende Proteine), insbesondere mGBP2 als auch mGBP7, zu der *T. gondii*-PV rekrutieren und akkumulieren können und eine zellautonome Immunität vermitteln (Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016; Kravets et al., 2012; MacMicking, 2012; Meunier et al., 2015; Pilla et al., 2014). Im Gegensatz zu mGBP2 mit einem C-terminalen Isoprenylierungsmotiv (CaaX), welches als essenziell für Membraninteraktionen und für die Rekrutierung zur PV beschrieben wurde (Cheng et al., 1991; Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016; Praefcke et al., 1999; Prakash et al., 2000; Stickney und Buss, 2000), beinhaltet mGBP7 keine CaaX-Box und interagiert durch einen bislang noch unbekanntem Mechanismus mit Membranen. Durch *Gene-targeting* in Mäusen konnte die essenzielle Rolle von mGBP2, und insbesondere von mGBP7, für das Überleben von *T. gondii* infizierten Mäusen nachgewiesen werden (Degrandi et al., 2013; Steffens et al., akzeptiert). Der Verlust von mGBP7 führte zu einer dramatischen Mortalitätsrate binnen 10 Tage nach Infektion mit *T. gondii* (Steffens et al., akzeptiert und siehe Abschnitt 1.3.1. Abbildung 4). Im Allgemeinen wurde den mGBPs eine wichtige Funktion bei Ruptur-Mechanismen der *T. gondii* PV-Membran (PVM) sowie bei der Kontrolle der parasitären Replikation *in vivo* zugeschrieben (Degrandi et al., 2013; Selleck et al., 2013; Yamamoto et al., 2012; Steffens et al., akzeptiert). Dabei ist die Lipid-Zusammensetzung der *T. gondii*-Membranen sowie der Mechanismus einer mGBP-Lipid-Interaktion noch weitgehend unklar.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit ist die Analyse der molekularen Mechanismen der mGBPs, insbesondere von mGBP7, auf die vitale Funktion der *T. gondii*-PVM sowie der Plasmamembran des Parasiten. Auf Grundlage vorheriger Experimente mit dem Nachweis, dass mGBPs Heteromere ausbilden können (Kravets et al., 2016), wurden die molekulare Rekrutierung und die Wechselwirkungen von mGBP7 mit weiteren Mitgliedern der mGBP-Familie analysiert. Diesbezüglich wurde die Lokalisation und Rekrutierung von mGBP7 mit mGBP2, mGBP3 und mGBP6 durch die Generierung doppelt transduzierter, mGBP7-defizienter MEF-Zelllinien untersucht. Dafür sollten unterschiedliche Mikroskopie-Verfahren wie *Live Cell Imaging*, Airyscan Mikroskopie und die hochauflösende SIM (*Structured Illumination Microscopy*)- und STED (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*)-Mikroskopie angewendet werden. Ebenso sollten spezifische Berechnungen durch den

Bitplane ImarisColoc Kanal als auch durch den Pearson Korrelationskoeffizienten, die Wechselwirkungen der untersuchten mGBPs quantifizieren. Diese Experimente sollten durch spezifische Rekrutierungs- und Akkumulationsanalysen mittels zeitbedingter *T. gondii*-Infektionen und Darstellung der mGBP-Assemblierung unterstützt werden.

Des Weiteren sollten die molekularen Akkumulations-Mechanismen von mGBP2 und mGBP7 charakterisiert werden. Dabei sollte die spezifische Protein-Lipid-Interaktion mit der *T. gondii*-PVM sowie mit der Plasmamembran analysiert und die Frage beantwortet werden, ob mGBP2 und mGBP7 eine direkte Lipid-Interaktion ohne interagierende Moleküle eingehen. Entsprechend sollten GFP- und mCherry-fusionierte Proteine mittels GFP-TRAP/RFP-TRAP-Technik aus den transduzierten Zellen isoliert, aufgereinigt und durch *Membrane Lipid Strips* auf potenzielle Lipid-Affinitäten analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sollten für den Aufbau künstlicher Membranen durch die GUV-Technologie genutzt werden, um spezifische Protein-Lipid-Interaktionen mittels Konfokalmikroskopie zu visualisieren. Die Frage welche Domäne von mGBP7 die potenzielle Membraninteraktion vermittelt, sollte anhand von mGBP7-Trunktionsmutanten und entsprechenden Interaktionsanalysen mittels *Membrane Lipid Strips*, der GUV-Technologie, sowie *in vitro* Infektionsanalysen aufgeklärt werden.

2. Material

2.1. Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ammoniummolybdat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Coomassie G-250	Merck, Darmstadt
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Roche, Basel, Schweiz
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP)	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxid Hybri-Max (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Distilled water (steril)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
dNTPs	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ECL	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
EGTA (Ethylen glycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll Typ 400	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
FluoroBrite DMEM Media	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Geneticin (G418)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Gentamycin	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
Glutathion	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	VWR International, Langenfeld
HEPES	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Interferon- γ , murin	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Immersionsöl W	Zeiss, Jena
Immersionsöl 518F	Zeiss, Jena
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-1-thi- β -D-galactopyranoside (IPTG)	Roth, Karlsruhe
jetPRIME Reagenzien und Puffer	Polyplus, Illkirch-Graffenstaden Frankreich
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine2000	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Lipide (gelöst in Chloroform): Cardiolipin Dipalmitoylphosphatidylcholin Phosphatidsäure Phosphatidylserin TexasRed	Avanti Polar Lipids, INC., Alabaster, Alabama, USA
Loading Dye Solution, orange (6x)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt

Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Malachitgrün	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Oxoid, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
NP-40 (IGEPAL)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Orange G	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Basel, Schweiz
Polybrene	Merck, Darmstadt
RPMI Medium	Biochrom, Berlin
Proteinase K (10mg/ml)	Roche, Basel, Schweiz
Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt am Main
qPCR Mastermix	Takyon, Eurogentec, Lüttich, Belgien
Re-Blot Plus Strong Solution	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Restriktionspuffer O-Buffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Saponin	Calbiochem, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Stickstoff	Merck, Darmstadt

TE-MED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Merck, Darmstadt
Transkriptionspuffer für cDNA-Synthese	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TRIzol	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Trypanblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Tween-20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Ziegenerum	DaKoCytomation, Glostrup, Dänemark

2.1.2 Antikörper

Antikörper und verwendete Konzentration	Generierung	Bezugsquelle
Anti-Maus- β -Actin (1:5000, in 5 % Milch-Lösung)	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti-GFP (1:1000, in 5 % Milch-Lösung)	Maus	Roche, Basel, Schweiz
Anti-mCherry (1:1000, in 5 % Milch-Lösung)	Maus	Clontech Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Anti-mGBP2 (mGBP2.1) (1:1000 in 5 % BSA-Lösung)	Kaninchen	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Anti-mGBP3 (mGBP3.2) (1:1000 in 5 % BSA-Lösung)	Kaninchen	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Anti-mGBP7 (mGBP7.2) (1:2500 in 5 % BSA-Lösung)	Kaninchen	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> [TP3] (SAG1) (1:700 in Saponin-Antikörperlösung)	Maus	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Ziege-anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt (1:2500)	Ziege	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt (1:2500)	Ziege	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Maus-IgG-AlexaFluor® 633 (1:200 in Saponin-Antikörperlösung)	Ziege	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Bezugsquelle
DAPI (1:2500 in PBS)	Roche, Basel (Schweiz)
GFP-Booster ATTO488 (1:200 in Saponin-Antikörperlösung)	Chromotek, Planegg-Martinsried
RFP-Booster ATTO647N (1:200 in Saponin-Antikörperlösung)	Chromotek, Planegg-Martinsried

2.1.4 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNA High Fidelity Polymerase	Roche, Basel, Schweiz
DNase I	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DNA T4 Ligase	Roche, Basel, Schweiz
DNA Taq-Polymerase	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Reverse Transkriptase	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNase	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNase Out	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien

2.1.4.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme	Bezugsquelle
Bgl II	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
EcoRV	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Nde I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Not I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Pst I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Sma I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Dpn I	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

2.1.5 CRISPR-CAS9 Nuklease Produkte

Die CRISPR-CAS9 Nuklease Produkte wurden von der Firma Integrated DNA Technology, Coralville, Iowa, USA, bezogen.

Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuklease
Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA: Mm.Cas9.GBP3.1.AA Mm.CaS9.GBP3.1.AC
Alt-R CRISPR-CAS9 tracrRNA
Alt-R Cas9 Electroporation Enhancer
Alt-R CAS9-Enzym

2.1.6 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Reagenzien und Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Beads: GFP-TRAP Beads RFP-TRAP Beads	Chromotek, Planegg-Martinsried
Bis-Tris Gele (4 – 12 %): 10 Well 15 Well	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Centrifugal Filter Units	Merck, Darmstadt
Cellview Cell Culture Slides	Greiner Bio-One, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cryotubes: 1 ml 1,8 ml	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Elektroporationsküvetten	VWR International, Langenfeld
Erlenmeyerkolben	Laborbedarf, Köln
Filterpapier: Whatman, Grade 3 CHR, 460 x 570 mm	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien
Glass Bottom Dishes, 35 mm, uncoated, No.2 und No. 1.5, gridded	MatTek Corporation, Ashland, Massachusetts, USA
Grid Box	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Großbritannien
Handschuhe, Micro-Touch Nitra-Tex	Ansell, Brüssel, Belgien
Imaging Dish Cover Glass 1.5	VWR International, Langenfeld
Lipid Strips: Membrane Lipid Strips PIP Strips PIP Array	Echelon, Salt Lake City, USA

Nitrocellulose-Membran Amersham™ Protran™ 0,45 nc	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Großbritannien
Objektträger	Engelbrecht GmbH, Medizin- und Labortechnik, Edermünde
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
Pipettenspitzen (steril und unsteril): 10 µl 20 µl 200 µl 1000 µl	Starlab International, Hamburg
Reagenzgläser, steril mit Korken	Laborglasshop, Schöps bei Jena
Spinning Columns	Chromotek, Planegg-Martinsried
Stripetten: 5 ml 10 ml 25 ml 50 ml	Costar, Corning, New York, USA
Tubes: Eppendorf Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml SafeSeal Microtubes 1,5 ml Röhrchen Tubes 15 ml, 50 ml Röhrchen Tubes 15 ml	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Greiner Bio-One, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tissue Culture Disk (steril): 15 mm 20 mm 25 mm	Falcon, Corning, New York, USA
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Vitrex™	VWR International GmbH, Darmstadt
Well Plates: 6-well plate (steril) 12-well plate (steril) 24-well plate (steril) 48-well plate (steril) 96-well plate Flachboden 96-well plate (steril) 96-well plate ELISA	Costar, Corning, New York, USA Costar, Corning, New York, USA Costar, Corning, New York, USA Costar, Corning, New York, USA Costar, Corning, New York, USA Costar, Corning, New York, USA Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zellkulturflaschen mit Filter: T25	Falcon, Corning, New York, USA

T75	
T162	
Zellschaber	Greiner Bio-One, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.7 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Abzug	Wrt-Laborbau, Stadtlohn
Analysenwaage, Chyo JL-180	Welabo, Düsseldorf
Analysenwaage Precisa Balances	Precisa Gravimetrics, Aldingen
Brutschrankschranke:	
BBD6220	früher Heraeus Instruments, jetzt Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hera Cell 240	früher Heraeus Instruments, jetzt Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Chemolumineszenz-Imager iNTAS ECL Chemostar	iNTAS Science Imaging Instruments, Göttingen
Dewargefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe
Digital Graphic Printer für Agarosegele	SONY, Minato, Japan
Elektrophoresekammer XCell Sure Lock Elektrophoresis Cell	Novex by Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Elektroporationsgerät, Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
ELISA Reader, Sunrise	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Eismaschine	Nordcap, Bremen
FACS Aria III	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Folienschweißgerät Severin Folio	Severin Elektrogeräte, Sundern
Function Generator Boadband Digital LW-1641	Calibration Control Equipment Laboratory, Bagh, Kokata, Indien
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank -80°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefriertruhe -80°C	Ewald Innovationstechnik GmbH, Rodenberg
Geldokumentationssystem Gel Doc™ XR+	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Kalifornien, USA
Hamilton™ Spritze	Hamilton, Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Heizblock Techne® Dri-Block® DB-3D	Merck, Darmstadt
ITO-coated Glassplatten 25 mm x 75 mm	Merck, Darmstadt

Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Kryo-Einfriergerät Mr. Frosty	VWR International GmbH, Langenfeld
Magnetrührer MR3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrührer IKA® RH basic2	IKA®-Werke GmbH, Staufen
Mikroskope:	
Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Axio Observer	Zeiss, Oberkochen
Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon, Chiyoda, Japan
Zeiss LSM780 mit Airyscan	Zeiss, Oberkochen
Zeiss ELYRA PS (CAI, HHU Düsseldorf)	Zeiss, Oberkochen
Leica TCS SP8 STED 3X (CAI, HHU Düsseldorf)	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Mikrowelle	Bosch, Erlangen
NanoDrop 1000	VWR International GmbH, Langenfeld
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH Meter MP225	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA
Pipetten	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipet-Boy, accu-jet	Brand, Wertheim
qRT-PCR Machine, CFX96	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Roller Mixer	Ratek, Victoria, Australien
Rotierapparat SB3-Stuart	Stuart, Cole-Parmer, Staffordshire, Großbritannien
Schüttler	
Schüttler PHMT	Grant Instruments, Cambridge, Großbritannien Carl Roth, Karlsruhe
Polymax 1040	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
GFL Wipp-Schüttler 3013	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
GFL Kreis-Schüttler 3015	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
GFL Kreis-Schüttler 3017	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
GFL Kreis-Schüttler 3019	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Spannungsquellen:	
Power 250	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PowerEase 90W	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Consort E861	Merck, Darmstadt
Consort EV243	Merck, Darmstadt
Sterilbank HeraSafe	früher Heraeus Instruments, jetzt Thermo Fischer

	Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stickstofftank	Air Liquide, Paris, Frankreich
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler T1, T3 und T-gradient	Biometra, Göttingen
Tischzentrifugen:	
MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Spectrafuge Mini	Labnet International, Edison, New Jersey, USA
Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Systeme:	
Vortex VWR	VWR International GmbH, Langenfeld
Vortex Labinco BV L46	Labinco, Breda, Niederlande
IKA® MS3 digital	IKA®-Werke GmbH, Staufen
Wasseraufbereitungssystem	
Milli-Q	Merck, Darmstadt
Millipore Elix	
Wasserbad Medingen W6	Köttermann GmbH & Co KG Labortechnik, Uetze
Western Blot, Semi-Dry Blotter	VWR International GmbH, Langenfeld
Zentrifugen:	
Sorvall RC-4	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Biofuge fresco	früher Heraeus Instruments, jetzt Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Megafuge 1.0R	früher Heraeus Instruments, jetzt Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.8 Kits

Kit-Bezeichnung	Bezugsquelle
DNA, RNA and Protein Purification Kit	Macherery-Nagel, Düren
ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
ECL Extended Duration Substrate, SuperSignal	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Expand™ High Fidelity PCR System	Merck, Darmstadt
GFP- und RFP-TRAP Kit	Chromotek, Planegg-Martinsried
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Basel, Schweiz
jetPRIME DNA Transfektion	Polyplus, Illkirch-Graffenstaden Frankreich
Ligase T4-Kit	Roche, Basel, Schweiz
Restriktionsverdau NEB-Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Quick-Change XL Site Directed Mutagenesis	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
TA Cloning® Kit 2.1	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.2. Medien und Puffer

2.2.1 Puffer und Stammlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
CLEM Mikroskopie (Kooperation mit AG Hensel)	
1 M HEPES Puffer (500 ml)	119,3 g HEPES in 500 ml dH ₂ O, pH 7,4 (pH mit HCl einstellen)
Blockierungslösung	0,2 M HEPES Puffer; 10 % Glycin
2x Fixierungslösung	5 % Glutaraldehyd; 10 mM CaCl ₂ ; 0,4 M HEPES Puffer
1x Fixierungslösung	2x Fixierungslösung 1:2 verdünnt
PFA-Fixierung	2 % PFA in PBS pH 7,4; 0,1 % Glutaraldehyd
Scrape-Puffer	0,2 M HEPES Puffer, 0,1 % BSA
DNA-Elektroporation	
Cytomix	120 mM KCl; 0,12 mM CaCl ₂ ; 10 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,6; 25 mM HEPES pH 7,6; 2 mM EGTA pH 7,6; 5 mM Mg Cl ₂ ; 3 mM ATP; 3 mM Glutathion
Chloramphenicol-Lösung	20 mM Chloramphenicol in Ethanol
GFP- und RFP-TRAP	
RIPA Puffer	10 mM Tris/Cl pH 7,5; 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA; 0,1 % SDS, 1 % Triton-X100; 1 % Desoxycholsäure zusätzlich eine <i>Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> – Tablette pro 10 ml
Dilution/Wasch Puffer	10 mM Tris/Cl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA zusätzlich eine <i>Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> – Tablette pro 10 ml
Glycin-Elution Puffer	200 mM Glycin pH 2,5
Neutralisationspuffer	1 M Tris/Cl pH 10,4
IDT CRSISPR/CAS9 System	
crRNA:tracrRNA Duplex	200 µM Alt-R CRISPR/CAS9 crRNA (gelöst in 1x TE-Puffer); 200 µM Alt-R CRISPR/CAS9 tracrRNA (gelöst in 1x TE-Puffer)

RNP Komplex	crRNA:tracrRNA Duplex; 61 μ M Alt-R Cas9 Enzym (16,7 μ l); 21,3 μ l PBS
Steriler Elektroporations-Komplex	RNP Komplex; 96 μ M Alt-R Electroporation Enhancer
Indirekte Immunfluoreszenz	
Fixierungslösung	4 % PFA in PBS pH 7,4
Permeabilisierungslösung	0,02 % Saponin in PBS
Blockierungslösung	0,002 % Saponin in PBS; 2 % Ziegen Serum
Antikörperlösung	0,0002 % Saponin in PBS; 2 % Ziegen Serum
Waschlösung	0,0002 % Saponin in PBS
DAPI Lösung	1:2500 DAPI in PBS
Malachitgrün GTPase Aktivitätsassay	
GTPase Reaktionspuffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5;
Stopplösung	220 mM Schwefelsäure (96 %) in 500 ml dH ₂ O
Färbelösung	0,112 g Malachitgrün; 12,98 ml Schwefelsäure (96 %); 87,07 ml dH ₂ O
Ammoniummolybdat Lösung	7,5 g Ammoniummolybdat in 100 ml dH ₂ O
PCR und Klonierungen	
10x PCR Puffer	500 mM KCl; 100 mM Tris/HCl pH 8,3; 15, 20, 25 mM MgCl ₂ ; 0,1 % Gelatine
dNTP-Mix	1 mM dATP; 1 mM dCTP; 1 mM dTTP; 1 mM dGTP
Agarosegel (0,8 – 2 %)	0,8 – 1,5 % Agarose in 1x TAE-Puffer
50x TAE-Puffer	2 M Tris pH 8; 1 M Eisessig; 0,1 M EDTA
5x DNA Auftragspuffer	15 % Ficoll Typ 400; 0,05% Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol
10x DNA Auftragspuffer	1 mg/ml Orange G; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 30 % Gelatine
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8; 1 mM EDTA
SDS-PAGE, Western Blot, Coomassie Staining	
5x Protein Ladepuffer	10 % SDS; 25 % β -Mercaptoethanol; 30 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,15 % Bromphenolblau; 45 % Glycerin
Laufpuffer	50 mM MOPS; 1 mM EDTA;

Transferpuffer	50 mM Tris pH 7,7; 0,1 % SDS 1 x Transferpuffer (Stammlösung 20x); 20 % Methanol; dH ₂ O
TBS-T	150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 8; 0,1 % Tween-20; in dH ₂ O
Re-Blot Plus Strong Solution	Stammlösung (10x) 1:10 mit dH ₂ O verdünnen
Coomassie Lösung	0,02 % Coomassie Brilliant Blue G250; 96 % Ethanol; 85 % (W/v) Phosphorsäure; 5 % Aluminiumsulfat
Blockierungslösungen	5 % Milchpulver in TBS-T oder 3 – 5 % BSA in TBS-T
ECL Lösungen	Kit-Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 pro Membran verwenden

2.2.2 Medien für Zellkulturen

Medium für:	Zusammensetzung
MEF-Zelllinien und HS27-Zelllinien	DMEM 10 % (v/v) FKS (inaktiviert für 30 min bei 56 °C) 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol
NIH3T3 Zellen und 293FT Zellen	DMEM 10 % (v/v) FKS (inaktiviert für 30 min bei 56 °C) 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin; 100 U/ml Streptomycin
<i>Live Cell Imaging</i> Medium	FluoroBrite 10 % (v/v) FKS (inaktiviert für 30 min bei 56 °C) 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Einfrier-Medium	DMEM 10 % (v/v) FKS (inaktiviert für 30 min bei 56 °C) 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) DMSO

2.2.3 Medium für Bakterienkulturen

Das Medium wurde vor der Verwendung durch Autoklavierung (121 °C, 2 bar, 20 min) sterilisiert. Dieses Medium wurde als Flüssig- und Festmedium verwendet.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	25 g LB medium, 1 l dH ₂ O Festzustand: + 15 g Agar/Liter Bakterienselektion: + 100 µg/ml Ampicillin

2.3. Verwendete Zelllinien, *Toxoplasma gondii* und Bakterien

2.3.1 Zelllinien

Zellen	Eigenschaften	Referenzen
293 FT	humane primäre embryonale Nierenzelllinie, schnell-wachsend, mit SV40 large T-Antigen	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
HS27	humane Vorhaut Fibroblasten, ATCC#CRL-1634™	ATCC, Manassas, Virginia, USA
MEF Zelllinien: Wildtyp mGBP2 ^{-/-} mGBP7 ^{-/-}	murine embryonale Fibroblasten, isoliert am Tag 14.5 p.c aus C57BL/6 Embryonen	isoliert und präpariert von Dr. Cornelia Beuter-Gunia
NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten ATCC#CRL-1658	ATCC, Manassas, Virginia, USA

2.3.2 Bakterien- und Toxoplasmenstämme

Organismus	Genotyp	Referenzen
<i>E. coli</i> DH5α	supE44, ΔlacU169, (Φ80lacZΔM15),relA1; hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; Hanahan, 1983
<i>Toxoplasma gondii</i> ME49	obligat intrazellulär replizierender Protozoa, Typ II Stamm	ATCC, Manassas, Virginia, USA; Parmley et al., 1994

2.4. Vektoren, Oligonukleotide und Lentiviren

2.4.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenzen
pWPXL	EF1-Promotor, Amp - Resistenz	D. Trono Laboratory, Lausanne, Schweiz

pWPXL/GFP	w/o-STOP	Kravets et al., 2012
pWPXL/mCh	w/o-STOP, EF1-Promotor, Amp – Resistenz	Klumpers, 2013; Kravets et al., 2016
pWPXL/GFP-mGBP2	EF1-Promotor, Amp - Resistenz	Klumpers, 2013; Kravets et al., 2016
pWPXL/mCh-mGBP2	EF1-Promotor, Amp - Resistenz	Kravets et al., 2016
pWPXL/mCh-mGBP3	EF1-Promotor, Amp - Resistenz	Kravets et al., 2016
pWPXL/mCh-mGBP6	EF1-Promotor, Amp - Resistenz	Kravets et al., 2016
pWPXL/mCh-mGBP7	EF1-Promotor, Amp - Resistenz	Kravets et al., 2016
pWPXL/GFP-mGBP7	EF1-Promotor, Amp - Resistenz	Kravets et al., 2016
pTUB(Chloramphenicol)-HA	Chloramphenicol- und Amp – Resistenz	Boris Striepen (Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, Athens, GA, USA)
pLP/VSVG	VSVG Glykoprotein für eine Lentivirus-Produktion, CMV Promotor, Amp – Resistenz	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
psPAX2	Verpackungsvektor, codiert Gag, Pol und Env für eine Lentivirus-Produktion, CMV Promotor, Amp – Resistenz	D. Trono Laboratory, Lausanne, Schweiz

2.4.1.1 Erstellte Plasmide

Plasmid-Name	Eigenschaft	Referenz
pWPXL/GFP-mGBP7 ^{K51A}	Punktmutation an der 51. Aminosäuren-Position von Lysin zu Alanin, EF1-Promotor, Amp - Resistenz	hergestellt durch Steffens
pWPXL/GFP-mGBP7 ^G	Trunktationsmutante bestehend aus der G-Domäne, EF1-Promotor, Amp - Resistenz	hergestellt durch Mock und Steffens
pWPXL/GFP-mGBP7 ^{ME}	Trunktationsmutante bestehend aus der ME-Domäne, EF1-Promotor, Amp - Resistenz	hergestellt durch Mock und Steffens
pWPXL/GFP-mGBP7 ^{Δ49}	Trunktationsmutante, Deletion der C-terminalen 49 Aminosäuren, EF1-Promotor, Amp-Resistenz	hergestellt durch Mock und Steffens
pWPXL/GFP-mGBP7 ^{Δ30}	Trunktationsmutante, Deletion der C-terminalen 30 Aminosäuren, EF1-Promotor, Amp-Resistenz	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Degrandi und Steffens

pWPXL/GFP-mGBP7 ^{Δ20}	Trunktationsmutante, Deletion der c-terminalen 20 Aminosäuren, EF1-Promotor, Amp-Resistenz	der Invitrogen, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Degrandi und Steffens
pTUB/mCh	Chloramphenicol- und Amp – Resistenz	hergestellt durch Steffens
pTUB/GFP	Chloramphenicol- und Amp – Resistenz	hergestellt durch Steffens

2.4.2 Primer

Die in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion International AG synthetisiert, aufgereinigt und lyophilisiert. Die Stocks wurden zu einer Endkonzentration von 100 pmol/μl resuspendiert.

Primername	Sequenz (5' – 3')
pWPXL WPRE1	CCACATAGCGTAAAAGGAGC
pWPXL GFP	CGACAACCACTACCTGAGCACC
pWPXL mCherry	CCACAACGAGGACTACACCATCG
pWPXL mCherry Bgl II	AATTAGATCTATGGTGAGCAAGGGCAGGAGG
pWPXL mCherry EcoRV	ATTAGATATCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
mGBP3_forward	CGTGTTGCGCAAACAAAAACCGA
mGBP3_reverse	CCCCACACCCAGAACG
pWPXL GFP-mGBP7 Bgl II	ATAAAGATCTATGGTGAGCAAGGGCG
pWPXL GFP-mGBP7 EcoRV	ATAAGATATCTTAGAGTTTTCTAACTTTGTC
pWPXL GFP-mGBP7 ^G fwd	ATTCCCGGGAGCATCTGGTCC
pWPXL GFP-mGBP7 ^G rev	GATTATCATATGACTCAATTGATAGCATCC
pWPXL GFP-mGBP7 ^{ME}	ATTCCCGGGAAGTGGAGACGTGC
pWPXL GFP-mGBP7 ^{Δ49} rev	GATTATCATATGACTCAATTCTCTCCTTATTTAGTTGAATC
pWPXL GFP-mGBP7 ^E rev	GATTATCATATGACTCATTAGAGTTTTCTAACTTTG
pWPXL GFP-mGBP7 ^{K51A} fwd	CCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCAC
pWPXL GFP-mGBP7 ^{K51A} rev	GTGAAGGTTAATTGCGCGCTTGGCGGCGTAATCATGG
pTUB mCherry Bgl II	AATTAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG
pTUB mCherry EcoRV	ATTAGATATCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
pTUB mCherry Pst I	ATTACTGCAGCTACTTGTACAGCTCG
pTUB GFP Bgl II	AATTAGATCTATGGTGAGCAAGGGCG
pTUB GFP Pst I	ATTACTGCAGCTACTTGTACAGCTCG
Oligo dT Primer	TTTTTTTTTTTTTTTTT

2.4.3 Sequenzen von Oligo-Nukleotiden und Sonden für qRT-PCR Analysen

Die Sonden wurden aus der Universal ProbeLibrary von Roche verwendet.

Primername	Sequenz (5' – 3')	Sonden-Nr.
β-Aktin fwd	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	106
β-Aktin rev	CGCTCAGGAGGAGCAATG	
mGBP2 fwd	TGAGTACCTGGAACATTCCTGAC	17
mGBP2 rev	AGTCGCGGCTCATTAAGC	
mGBP3 fwd	GGCTGAGGACTGTCCCTGT	21
mGBP3 rev	CATGGTCCACTCGGAAGC	

2.4.4 Lentiviren

Die hier vorgestellten S2-Organismen wurden mit Hilfe der psPAX2 und pLP/VSVG Vektoren hergestellt und für die lentivirale Transduktion neuer Zelllinien verwendet.

Spender	Empfänger	Ausgangsvektor	Insert
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-mCherry-mGBP2	mCherry-mGBP2
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-mCherry-mGBP3	mCherry-mGBP3
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-mCherry-mGBP6	mCherry-mGBP6
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-mCherry-mGBP7	mCherry-mGBP7
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-GFP-mGBP2	GFP-mGBP2
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-GFP-mGBP7	GFP-mGBP7
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-GFP-mGBP7 ^G	GFP-mGBP7 ^G
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-GFP-mGBP7 ^{ME}	GFP-mGBP7 ^{ME}
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-GFP-mGBP7 ^{Δ49}	GFP-mGBP7 ^{Δ49}
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-GFP-mGBP7 ^{Δ20}	GFP-mGBP7 ^{Δ20}
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-GFP-mGBP7 ^{Δ30}	GFP-mGBP7 ^{Δ30}
Mus Musculus	Lentivirus (VSVG)	pWPXL-GFP-mGBP7 ^{K51A}	GFP-mGBP7 ^{K51A}

2.5. Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden durch die Standard-Abweichung (\pm SD) oder durch den Standard-Fehler (\pm SEM) dargestellt. Für Berechnungen der statistischen Signifikanz wurde der *unpaired two-tailed Student's t-test* verwendet. Die Signifikanzen wurden folgendermaßen festgelegt:

p < 0,05 entspricht *

p < 0,01 entspricht **

p < 0,001 entspricht ***

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien erfolgte in Oberflächen-beschichteten Zellkulturflaschen, Petrischalen oder Well-Platten unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden je nach Zelllinie, Kulturgefäß und Zelldichte in einem Verhältnis von 1:2, 1:3 oder 1:4 in die entsprechenden Kultivierungsgefäße ausgesät und nach zwei bis drei Tagen mit einer Konfluenz von 80 – 100 % passagiert. Das Passagieren der adhärennten Zellen erfolgte durch Waschen mit PBS und anschließendem Ablösen durch Trypsin/EDTA (0,05 % oder 0,25 %) für drei bis fünf Minuten bei 37 °C. Mit frischem, FKS beinhaltendem Medium wurde die Enzymaktivität des Trypsins gestoppt, die gelösten Zellen aufgenommen und für fünf Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Es folgte die Zellzählung mittels Neubauer-Kammer und die Bestimmung der Zellviabilität durch die Trypanblau-Färbung. Anschließend wurden die Zellen erneut in die entsprechenden Kultivierungsgefäße überführt und bei 37 °C in einem befeuchteten Inkubator und bei 8 % CO₂ inkubiert.

Für das Einfrieren der Zellen wurde Medium mit einem Zusatz von 10 % DMSO verwendet. DMSO soll die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses verhindern und entsprechend zu einer erhöhten Zellviabilität beitragen. Für ein langsames Einfrieren der Zellen wurden diese in Cryotubes überführt und entweder für 30 Minuten bei –20 °C und üN bei –80 °C, oder durch die Lagerung in eine Kühlbox mit Isopropanol (Mr. Frosty) direkt bei –80 °C runtergekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen musste schnell erfolgen, da DMSO toxisch wirkt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml frisches, vorgewärmtes Medium aufgenommen und durch eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1.200 rpm pelletiert. Die konzentrierten Zellen wurden mit frischem Medium resuspendiert und in Kulturgefäßen ausgesät.

3.1.2 Kultivierung von *T. gondii*

Für die Kultivierung der ME49-*T. gondii* wurden 1×10^6 Tachyzoiten in einer T25-Zellkulturflasche auf einen HS27-Zellmonolayer überführt. Die Tachyzoiten infizierten die Wirtszellen und bildeten eine PV, in der die parasitäre Replikation mit anschließender Zelllyse stattfand. Entsprechend konnten die Tachyzoiten aus dem Überstand entnommen und bei RT für 5 Minuten und 700 rpm zentrifugiert werden. Das so gewonnene Pellet mit Wirtszellrückstände wurde verworfen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt des Überstandes für 15 Minuten bei 1.400 rpm pelletierte die Parasiten, welche in frischem Medium resuspendiert, gezählt und auf neue HS27-Zellen für eine Kultivierung ausgesät beziehungsweise für weitere Versuche verwendet wurden.

3.1.3 Lentivirale Transduktion

Für die Lentivirus-Produktion wurden 293FT-Zellen nach zweimaligen Passagieren mit einer Konfluenz von 80 % in einer 10 cm-Petrischale verwendet. Die Transfektion fand mit jetPRIME Reagenzien statt.

500 µl	jetPRIME Puffer
3,75 µg	psPAX2
1,25 µg	pLP/VSVG
5 µg	pWPXL-Vektor mit dem Expressionsprodukt
Reaktionsansatz 10 sek vortexen und zentrifugieren	
+ 20 µl	jetPRIME Reagenz
Reaktionsansatz 10 sek vortexen und zentrifugieren	
Reaktionsansatz 10 Minuten bei RT inkubieren	

Das Transfektions-Gemisch wurde auf 293FT-Zellen gegeben und für 24 - 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zielzellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und mussten für die Transduktion eine Konfluenz von 100 % erreicht haben. Aus dem Überstand der 293FT-Zellen wurden die Lentiviren geerntet und bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Pro Milliliter Virusüberstand wurden 5 µl Polybrene hinzugefügt und insgesamt 500 µl Reaktionsansatz für die Transduktion/Well verwendet.

30 min	Inkubation bei 37 °C
99 min	Zentrifugation bei 1.200 rpm
6 h	Inkubation bei 37 °C
Erneuerung des Mediums	
48–72 h	Inkubation bei 37 °C

Eine Kontrolle der Zellmorphologie und Fluoreszenz verdeutlichten den Erfolg der lentiviralen Transduktion. Nach zweimaligen Passagieren unter S2-Bedingungen konnten die Zellen durch das FACS Aria II durchflusszytometrisch sortiert und unter S1-Bedingungen kultiviert werden.

3.1.4 Infektion mit *T. gondii*

Die lentiviral transduzierten Zelllinien wurden am Vortag mit einer Zahl von 10.000 Zellen/Well auf Deckgläschen in 24-Well Platten, in speziellen *Live Cell Imaging* Dishes oder *MatTek-Dishes* ausgesät. Diese wurden 16 Stunden vor der *T. gondii*-Infektion mit 100 Units/ml IFN γ stimuliert und bei 37 °C inkubiert. Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, wurden die *T. gondii*-Tachyzoiten aus den frisch lysierten Wirtszellen geerntet, aufgereinigt und in einem 1:50-Verhältnis auf die Zellen gegeben. Im Allgemeinen betrug die Infektionszeit 2 Stunden bei 37 °C. Im Anschluss wurden die infizierten Zellen für weiterführende Immunfluoreszenz-Analysen verwendet.

3.1.5 *In vitro* Infektionsanalysen

In dieser Forschungsarbeit wurden verschiedene *in vitro* Infektionsanalysen durch Immunfluoreszenz-basierte Verfahren durchgeführt. Für jedes Verfahren wurde die Infektion mit *T. gondii* vollzogen (Abschnitt 3.1.4). Die fixierten Zellen sowie die *Live Cell Imaging Movies* wurden mit einem Zeiss LSM 780, Zeiss ELYRA PS (CAI, HHU Düsseldorf) und Leica TCS SP8 STED 3X (CAI, HHU Düsseldorf) aufgenommen und durch die ZEN Software, ImageJ/Fiji und Bitplane Imaris ausgewertet.

3.1.5.1 Immunfluoreszenzfärbung für konfokal-mikroskopische Analysen und Airyscan-Mikroskopie

Die zu analysierenden Zellen wurden wie beschrieben auf sterilen Deckgläschen in 24-Well Platten ausgesät, mit IFN γ stimuliert und mit *T. gondii* infiziert (Abschnitt 3.1.4). Nach entsprechender

Infektionszeit wurde das Medium abgenommen und die infizierten Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Es folgten mehrere Arbeitsschritte für die Immunfluoreszenz-Färbung:

10 min	Fixierung mit PFA (4 %)
15 min	Permeabilisierung mit 0,02 % Saponin in PBS
20 min	Zellblockierung mit 0,002 % Saponin in PBS
45 min	1. Antikörperlösung (SAG1 1:700)
45 min	2. Antikörperlösung (AlexaFlour633 1:200)
3 min	DAPI-Zellkernfärbung

Zwischen den Arbeitsschritten wurde jeweils 2 x mit der Saponin-PBS-Waschlösung gewaschen. Die Antikörper-Inkubation erfolgte unter abgedunkelten Bedingungen. Eine Anfärbung der fluorophoren mGBPs war nicht notwendig, da die N-terminal fusionierten Fluoreszenz-Konstrukte im Konfokalmikroskop detektiert werden konnten. Die Deckgläschen wurden mit Fluoromount-G auf einen Objektträger fixiert und für mikroskopische Analysen verwendet (Mikroskop: Zeiss LSM 780, Software: ZEN Software, Bitplane Imaris).

3.1.5.2 Immunfluoreszenzfärbung für die SIM- und STED-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenzfärbung für die SIM- und STED-Mikroskopie erfolgte wie in Abschnitt 3.1.5.1 beschrieben, mit Ausnahme der Verwendung von GFP- und RFP-Boostern in einer Konzentration von 1:200. Diese Booster konnten zeitgleich in einer Antikörperlösung verwendet werden und mussten für 1 Stunde abgedunkelt auf den Zellen inkubieren. Aufgrund der starken Signale wurde auf eine *T. gondii*- sowie DAPI-Färbung verzichtet (SIM-Mikroskopie: Zeiss ELYRA PS; STED-Mikroskopie: Leica TCS SP8 STED 3X, Software: Zen Software, ImageJ/Fiji).

3.1.5.3 Live Cell Imaging

Durch das *Live Cell Imaging* können dynamische Regulationsprozesse innerhalb einer lebenden Zelle detektiert und analysiert werden. Die Zellen wurden auf *Live Cell Imaging* Platten ausgesät und mit IFN γ stimuliert. Für diese Untersuchungen wurde das FluoroBrite-Medium ohne Phenolrot verwendet, um Autofluoreszenz-Effekte zu vermindern. Die Zellen wurden mit *T. gondii* infiziert und unmittelbar darauf am S2-Konfokalmikroskop mit dem 40x-Objektiv und einer wässrigen Emulsion analysiert (Mikroskop: Zeiss LSM 780, Software: Zen software, Bitplane Imaris).

3.1.5.4 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM)

Die CLEM-Mikroskopie wurde in Kooperation mit der AG Hensel (Osnabrück) durchgeführt. Vorab wurde eine Probe auf die Qualität der Fixierung getestet. Dafür wurden 1×10^6 Zellen am Vortag in 6 cm- oder 10 cm Petrischalen ausgesät und mit IFN γ stimuliert. Es folgten weitere Arbeitsschritte:

2 h	<i>T. gondii</i> -Infektion
1 h	1 x Fixierungslösung (37 °C)
3 x	Waschen mit 0,2 M HEPES-Puffer
3 min	1 ml <i>Scrape</i> -Puffer

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und an die AG Hensel für weitere Untersuchungen versendet. Für die CLEM-Mikroskopie

wurden die zu analysierenden Zellen in *MatTek-Dishes* ausgesät, mit IFN γ stimuliert und mit *T. gondii* infiziert. Es wurde eine Fixierung mit anschließender Mikroskopie durchgeführt:

30 min	Fixierungspuffer (2 % PFA und 0,1 % Glutaraldehyd)
3 x	Waschen mit 0,2 M HEPES-Puffer

Nach dem Waschen der Probe erfolgte die lichtmikroskopische Analyse am Zeiss LSM 780, bei der mehrere Positionen pro Dish ausgesucht und aufgenommen werden konnten. Anschließend folgten die zweite Fixierung und der nachfolgende Versand an die Universität Osnabrück, wo EM-Aufnahmen durchgeführt wurden. Die zweite Fixierung wurde folgendermaßen durchgeführt:

1 h	1 x Fixierlösung (37 °C)
3x	Waschen mit 0,2 M HEPES-Puffer
15 min	HEPES-Glycin Blockierungspuffer
3 x	Waschen mit 0,2 M HEPES-Puffer

3.1.6 Kolokalisationsberechnungen von *Live Cell Imaging Movies*

3.1.6.1 Bitplane ImarisColoc Kanal

Das Programm ImarisColoc (Bitplane Imaris Software) für Bild- und Videobearbeitungen ermöglicht die Veranschaulichung kolokalisierender Proteine in einer konfokal-mikroskopischen Aufnahme. Eine Kolokalisation beschreibt die räumliche Überlappung zweier Proteine, in diesem Fall zweier Fluoreszenz-markierter Proteine. Die bildgebende Einheit Voxel definiert dabei das dreidimensionale Äquivalent eines Pixels. Die zu analysierenden Proteine entsprechen in bildgebenden Aufnahmen Voxel, die durch drei Koordinaten eines orthogonalen Achsensystems beschrieben werden. Überlagernde, kolokalisierende Voxel werden in den Analysen durch eine weiße Farbmarkierung gekennzeichnet. Die Berechnung der Strahlungsgrenzwerte der verwendeten Fluoreszenzen mit einer entsprechenden Maskierung der Hintergrundfluoreszenz (für die Vermeidung falsch positiver Ergebnisse), werden bei der Verwendung des automatisierten ImarisColoc Kanals durch festgestellte Berechnungen des *National Institute of Health* durchgeführt. Es ist ebenfalls möglich eine manuelle Bedienung des ImarisColoc Kanals zu verwenden, wobei die Grenzwerte der einzelnen Fluoreszenzstrahlungen separat eingestellt werden. Für diese Forschungsarbeit wurden die automatisierten Berechnungen des *National Institute of Health* für alle untersuchten *Live Cell Imaging* Aufnahmen angewendet (Bitplane Imaris – ProductDetails).

3.1.6.2 Korrelationsberechnung nach Pearson

Die Korrelationsberechnung nach Pearson verdeutlicht die Stärke einer linearen Korrelation zwischen zwei Variablen. Der Korrelationskoeffizient kann einen Wert zwischen -1 und +1 einnehmen. Im Allgemeinen bedeutet der -1-Wert eine totale negative Korrelation, ein Wert von 0 keine Korrelation und ein Wert von +1 eine totale positive Korrelation. Bei Korrelationswerten bis 0,5 wird kein, beziehungsweise ein sehr schwacher Zusammenhang detektiert. Werte zwischen 0,5 und 0,8 verdeutlichen einen mittelstarken Zusammenhang und Werte zwischen 0,8 und 1 zeigen eine sehr starke Korrelation der Proteine. Korrelationswerte im negativen Bereich und damit eine totale negative Korrelation sind in der Biologie selten vorhanden und in diesem Fall nicht präsent. Bei der

Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass ein niedriger Wert nicht ausschließt, dass eine Interaktion besteht, sondern einzig und allein kein linearer Zusammenhang vorhanden ist (Grundlagen der Statistik; Wissenschafts-Thurm).

3.1.7 DNA-Transfer in *T. gondii*

Für die Transfektion eines pTUB-Expressionsplasmids in *T. gondii* mussten die Tachyzoiten extrazellulär aus den frisch lysierten Wirtszellen vorliegen. Die Plasmid-DNA (pTUB/mCherry oder pTUB/GFP) wurde durch Elektroporation in die Parasiten eingebracht. Dafür wurden die Parasiten wie in Abschnitt 3.1.2 aus dem Überstand geerntet, zentrifugiert, gewaschen und pelletiert. Die Parasiten wurden in 800 µl Elektroporationspuffer (Cytomix) aufgenommen und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 75 µg Plasmid-DNA und die Überführung des Gemisches in eine Elektroporationsküvette. Die Elektroporation wurde bei *low range*, einem Resistenzwiderstand von 50 Ohm, 25 kap 2 kV und einer Dauer von circa 0,4 Millisekunden durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die elektroporierten Parasiten auf eine T25-Zellkulturflasche mit einem HS27-Monolayer gegeben und direkt unter einer Chloramphenicol-Selektion mit einer Endkonzentration von 20 µM gehalten.

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Zellyse

Die Zellen wurden in einer Anzahl von 1×10^6 bis 1×10^7 kultiviert und mit Trypsin/EDTA behandelt (Abschnitt 3.1.1). Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (RIPA) aufgenommen (100 µl/ 1×10^6 Zellen), in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und für 3 Minuten durch mehrmaliges auf- und ab pipettieren resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten mit einer Ansatzdurchmischung nach jeweils 10 Minuten. Das Tube wurde für 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Tube überführt und für weitere Versuche verwendet, das Zellpellet wurde verworfen.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Pierce BCA Protein Assay Kit)

Die Proteinkonzentration wurde nach Angaben des Herstellers mittels Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt. Dafür wurden die Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 vermischt und zu je 40 µl in einer 96-Well ELISA Platte vorgelegt. Es wurden 2 µl BCA-Standard [2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0] sowie die lysierte Proteinprobe (Abschnitt 3.2.1, aus dem Überstand) hinzugefügt und für 30 Minuten bei 37 °C abgedunkelt geschüttelt. Die optische Dichte der abgekühlten Proben wurde durch den ELISA Reader bei 562 nm photometrisch gemessen und mittels BCA-Standardkurve (0 – 2 mg/ml) berechnet.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proben wurden in einer gewünschten Proteinkonzentration mit einem 5x Ladepuffer unter einem Abzug vereint, 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und für die 4 – 12 % Bis-Tris-Gradientengele verwendet. Die Gelkammer wurde befüllt mit 1x Running Puffer und die Proben sowie 5 µl des Protein-Markers konnten aufgetragen werden. Die Proteine wurden durch das Aufkochen bei 95 °C

und der Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT (im Ladepuffer) denaturiert und bei konstanten 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Entsprechend konnte das Molekulargewicht der verschiedenen Proben mittels Antikörper-spezifischer Detektion nachfolgend bestimmt werden.

3.2.4 Western Blot (semidry)

Die aufgetrennten Proteine der SDS-PAGE wurden mittels semidry Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dafür wurden die Nitrocellulose-Membran und sechs Whatman Papiere in einem 1x NuPage Transferpuffer mit Methanol äquilibriert. Es folgte eine Schichtung von drei Whatman Papieren, der Nitrocellulose-Membran, dem SDS-Gel und erneut drei Whatman Papieren (von unten nach oben) in einer Blotkammer, welche fest verschlossen wurde. Die Proteine der SDS-PAGE wurden bei einer Stromstärke von 110 mA/Blot für eine Stunde auf die Membran transferiert. Nach dem Blotten wurde die Membran in ein 50 ml Falcon überführt und mit entsprechender Blockierungslösung für eine Stunde bei RT blockiert. Es folgte ein Waschschrift in TBS-T und die Zugabe des ersten Antikörpers in entsprechender Lösung μ N bei 4 °C auf einem Roller. Am Folgetag wurde die Membran dreimalig mit TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen und anschließend in einer sekundären Antikörper-Lösung für eine Stunde, abgedunkelt auf einem Roller, inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschriffe mit TBS-T und eine Detektion durch Chemolumineszenz (ECL-Lösung). Um weitere Proteine auf derselben Membran detektieren zu können, war es möglich diese zu Strippen und damit die Antikörperbindungen abzulösen. Entsprechend wurden die Membranen nach der ECL-Detektion mit dH_2O gewaschen, anschließend für 30 Minuten mit der Re-Blot-Stripping-Lösung inkubiert und erneut mit dH_2O und mit TBS-T gewaschen. Die Membran konnte wiederholt geblockt und mit Antikörpern inkubiert werden.

3.2.5 Sensitive Coomassie-Färbung

Für den Reinheits-Nachweis verschiedener Proben wurde eine sensitive Coomassie-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese aus der Gelkammer entnommen, mit dH_2O gewaschen und μ N bei RT in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Das Gel wurde anschließend für 12 Stunden mit dH_2O gewaschen, in einer Folie eingeschweißt und gescannt.

3.2.6 GFP-TRAP/RFP-TRAP

Die GFP-TRAP-/RFP-TRAP-Methode wird für die Isolation von GFP- oder mCherry-gekoppelten Proteinen aus dem Zelllysate verwendet. Die Zellen wurden mittels RIPA-Puffers lysiert, resuspendiert und zentrifugiert (Abschnitt 3.2.1). Der Überstand mit den lysierten Proteinen wurde in Spinning Columns überführt, in denen sich bereits äquilibrierte GFP- oder RFP-Beads befanden (30 μ l Beads-Lösung für 500 μ l Zelllysate). Die Spinning Columns wurden verschlossen und jeweils in 2 ml Eppendorf Tubes überführt. Es folgte eine *end-over-end* Rotation für 2 Stunden bei 4 °C. Anschließend wurden die Spinning Columns geöffnet und innerhalb der Tubes für 2 Minuten bei 4 °C und 3.000 rpm zentrifugiert. Damit befanden sich die immunopräzipitierten GFP- oder mCherry-gekoppelten Proteine an den jeweiligen Beads innerhalb der Spinning Columns und die restlichen lysierten Zellbestandteile im Überstand, welcher verworfen werden konnte. Die Protein-Bead-Komplexe wurden mit 4 °C kaltem Waschpuffer zwei Mal gewaschen, bevor die saure Abkopplung der Proteine erfolgte. Die Spinning Columns wurden erneut verschlossen und zu den

Protein-Bead-Komplexen wurden 50 μl 0,2 M Glycin-Puffer für 30 Sekunden unter konstantem Mixen hinzugefügt. Daraufhin wurde das Spinning Column wieder geöffnet, in ein neues Eppendorf Tube überführt und bei 3.000 rpm und 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den entkoppelten GFP- oder mCherry-fusionierten Proteinen wurde in einem frischen Eppendorf Tube aufgefangen, worin sich bereits 5 μl 1 M Tris-Base pH 10,4 zum Neutralisieren befand. Anschließend konnte die Konzentration der isolierten Proteine mittels BCA Protein Assay bestimmt werden (Abschnitt 3.2.2).

3.2.7 Malachitgrün GTPase Aktivitäts-Assay

Die isolierten Proteine wurden durch das GTPase Aktivitäts-Assay auf ihre Funktionalität untersucht. Die Reaktionsansätze wurden folgendermaßen zusammen pipettiert:

<u>Protein-Reaktionsansatz:</u>		<u>Negativ-Kontrolle w/o Protein</u>	<u>Negativ-Kontrolle w/o MgCl₂</u>
5 μg	Protein	0 μg Protein	5 μg Protein
1 μl	MgCl ₂	1 μl MgCl ₂	0 μl MgCl ₂ /+ 4 μg EDTA
5 μl	GTP	5 μl GTP	5 μl GTP
X μl	GTPase Puffer	X μl GTPase Puffer	X μl GTPase Puffer
100 μl	Totalvolumen	100 μl Totalvolumen	100 μl Totalvolumen

Mit Ausnahme der 5 μl GTP wurden alle Komponenten in einem 1,5 ml Eppendorf Tube auf Eis vorgelegt und vermischt. Der Versuch begann nach der GTP-Zugabe. Sofort wurden in einer Doppelbestimmung jeweils 25 μl aus dem Totalvolumen in eine 96-Well Platte mit eiskalter Stopplösung (20 mM Schwefelsäure in 175 μl /Well) überführt (Nullwerte). Daraufhin wurde das Eppendorf Tube in einem Heizblock bei 37 °C inkubiert. Nach 20 Minuten wurden aus diesem Versuchsansatz erneut je 25 μl in einer Doppelbestimmung in die 96-Well Platte mit Stopplösung überführt. Durch die Hydrolyse von GTP entsteht anorganisches Phosphat. Die Menge des freien Phosphats wurde mit einer Malachitgrün-Färbelösung nach einer 15-minütigen Inkubation bei 595 nm detektiert (50 μl /Well). Zur Berechnung der Enzymaktivität (nmol/min/mg) musste von dem 20-minütigen, mittleren Absorptionswert der mittlere Nullwert subtrahiert werden.

3.2.8 Detektion potenzieller Lipid-Bindungen durch *Membrane Lipid Strips*

Die isolierten Proteine wurden auf potenzielle Lipid-Bindungen durch die Verwendung von *Membrane Lipid Strips* untersucht. Die Nitrocellulose-*Strips* beinhalten 15 standardisierte Membranlipide in einer Konzentration von 100 pmol per Spot. Die *Lipid Strips* wurden mit einer BSA-Blockierungslösung (3 %) für eine Stunde auf einem Roller blockiert und anschließend mit TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit den isolierten Proteinen in einer Konzentration von 1,25 μg in einer 3 % BSA-Lösung für eine Stunde bei RT. Die Proteinlösung wurde verworfen und die Membran drei Mal mit TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen. Ähnlich wie bei der Western Blot Analyse wurde anschließend eine primäre Antikörper-Lösung verwendet, die μN bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert worden ist. Es folgten drei Waschschrte mit TBS-T und die sekundäre Antikörper-Lösung für eine Stunde bei RT. Nachdem die sekundäre Antikörper-Lösung verworfen und die Membran mit TBS-T gewaschen wurde, konnte die ECL-Lösung für eine Chemolumineszenz-Detektion

verwendet werden. Die Membranen sind sehr lichtempfindlich und mussten konstant im Dunkeln gehalten werden.

3.2.9 Giant Unilamellar Vesicle (GUV) Technologie

Für die Präparation der GUVs wurden vorab zwei Indiumzinnoxid (ITO)-beschichtete Objektträger mit Ethanol und Chloroform gereinigt. Auf den unbeschichteten Glasseiten wurde ein Kreis eingezeichnet. Die Lipid-Lösung (2x 10 µl) wurde in dem kreisförmigen Bereich auf den beschichteten (!) Seiten mit Hilfe einer Hamilton-Spritze aufgetragen und verteilt. Dieser Bereich wurde anschließend mit Vitrex eingegrenzt. Die beiden Objektträger, mit der beschichteten Seite innen liegend, wurden zusammengepresst und mit 400 µl Sukrose-Lösung (10 %) befüllt. Es folgte eine abgedunkelte Elektroformation für 3 Stunden bei einer Frequenz von 11 Hz und einer Spannung von 1,2 V. Anschließend konnten die GUVs innerhalb der Sukrose-Lösung geerntet und in ein Eppendorf Tube überführt werden (Lagerung für 2 Tage bei 4 °C). Die GUVs können unterschiedliche Größen zwischen 5 - 70 µm aufweisen. Die Zusammensetzung der GUVs wird in mol % (Stoffmengenprozent) angegeben und verdeutlicht den Stoffmengenanteil des vollständigen GUVs in Prozent (Stoffmengenanteil: relativer Anteil einer Komponente eines Stoffgemisches):

<u>TexasRed-GUVs</u>		<u>Ungefärbte GUVs</u>	
74,25 mol %	DOPC	75 mol %	DOPC
20 mol %	Cholesterol	20 mol %	Cholesterol
0,75 mol %	TexasRed	5 mol %	CL, PA oder PS
5 mol %	CL, PA oder PS		

In die Wells eines *Cellview Cell Culture Slides* wurden 200 µl PBS vorgelegt und 30 µl GUV-Lösung hinzugefügt. Nach kurzer Zeit wurden 1,25 µg isoliertes, aufgereinigtes, GFP- und/oder mCherry-gekoppeltes Protein hinzugegeben und am Konfokalmikroskop Zeiss LSM 780 analysiert.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben in Zellkulturflaschen kultiviert. Bei einer Zell-Konfluenz von 80 – 90 %, konnte eine RNA Isolation durchgeführt werden. Die trypsinierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und verwendet (RNA-Lagerung bei – 80 °C):

Zentrifugation	5 Min, 1.200 rpm
Überstand wird verworfen, Zellen in PBS gewaschen und zentrifugiert	5 Min, 1.200 rpm
Zellpellet wird in 1 ml Trizol aufgenommen (Abzug)	5 Min Inkubation
lysierte Zellen in 1,5 ml Eppendorf Tube (autoklaviert) überführen	
200 µl Chloroform hinzugeben und vorsichtig schütteln	3 Min Inkubation
Zentrifugation bei 4 °C	15 Min, 8.000 rpm
obere Phase abnehmen und in ein autoklaviertes Tube überführen	
500 µl Isopropanol hinzugeben, vermischen	10 Min Inkubation
Zentrifugation bei 4 °C	10 Min, 8.000 rpm

Überstand wird verworfen, das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen	
Zentrifugation bei 4 °C	5 Min, 6.000 rpm
Überstand wird vorsichtig verworfen und das Pellet getrocknet	
Pellet wird in 100 µl DEPC-H ₂ O aufgenommen und bei 56 °C gelöst	10 Min

3.3.2 cDNA-Synthese

Die Konzentration der zuvor gewonnenen RNA wurde am NanoDrop bestimmt und enzymatisch in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz wurde in einem autoklavierten 1,5 ml Eppendorf Tube vermischt und für 2 Minuten bei 70 °C mit direkter Abkühlung auf Eis inkubiert:

1,5 µl	RNA in 10 µl DEPC-H ₂ O
+ 1,0 µl	Oligo-dT Primer 10 µM

Es folgte die Herstellung eines Mastermixes:

1,0 µl	dNTPs für RNA
4,0 µl	5x Transkriptionspuffer
2,0 µl	DTT
1,0 µl	RNase out
1,0 µl	Reverse Transkriptase

Es wurden 9 µl Mastermix zu dem RNA-Primer-Ansatz hinzugefügt, sodass ein Totalvolumen von 20 µl bestand. Die Probe wurde für 1 Stunde bei 37 °C erwärmt und anschließend für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Zu dem Versuchsansatz wurden 80 µl dH₂O hinzugefügt.

3.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR detektiert den Verlauf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Echtzeit. Das Nutzen einer Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonde ermöglicht die Quantifizierung des PCR-Produktes. Die Fluoreszenzmessung erfolgt nach jedem PCR-Zyklus und nimmt proportional zu der Menge des PCR-Produktes zu. Auf Eis wurde folgender Reaktionsansatz angesetzt:

5 µl	cDNA
0,3 µl	Primer 1
0,3 µl	Primer 2
12,5 µl	qPCR Mastermix
0,5 µl	Sonde
6,4 µl	dH ₂ O

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

1.	DNA Denaturierung	95 °C	10 Minuten
2.	DNA Denaturierung	95 °C	15 Sekunden
3.	Primerhybridisierung	60 °C	1 Minute
4.	Ende	4 °C	∞

Die Schritte 2 und 3 wurden zyklisch 40x wiederholt. Nach Schritt 3 wurde unmittelbar die Fluoreszenz gemessen und entsprechend die PCR-Produktmenge quantifiziert. Die Geschwindigkeit

der Fluoreszenz-Zunahme während der RT-PCR konnte in CT-Werten dargestellt werden, welche mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Berechnung Rückschlüsse auf die Gen-Expression lieferte.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion basiert auf die enzymabhängige Vervielfältigung bestimmter Gen-Sequenzen einzelsträngiger DNA-Ketten. Folgender Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt:

1 μl	DNA-Template (circa 100 ng)
1 μl	dNTP Mix (10 mM)
1 μl	forward Primer
1 μl	reversed Primer
1 μl	Polymerase (High Fidelity)
10 μl	Reaktionspuffer (High Fidelity)
35 μl	dH ₂ O

Durchführung des Reaktionszyklus unter folgenden Bedingungen:

1.	DNA Denaturierung	95 °C	10 Minuten
2.	DNA Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
3.	Primerhybridisierung	53-60 °C	30 Sekunden
4.	Polymerase-Verlängerung	72 °C	1:30 Minuten
Wiederholung der Schritte 2 bis 4		10x	
5.	DNA Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
6.	Primerhybridisierung	53-60 °C	30 Sekunden
7.	Polymerase-Verlängerung	72 °C	1:30 Minuten
Wiederholung der Schritte 5 bis 7		20x	
8.	Polymerase-Verlängerung	72 °C	5 Minuten
9.	Ende	4 °C	∞

3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Die analytische Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Ein kleines Gel (1 %) besteht aus 0,5 g Agarose und 50 ml 1x TAE-Puffer. Die Agarose wurde in einer Mikrowelle gelöst und nach der Abkühlung zusätzlich mit Ethidiumbromid (2 μl /100 ml) versehen. Das Ethidiumbromid ist eine DNA-bindende Substanz, die zwischen DNA-Strängen interkalieren kann und durch UV-Bestrahlung sichtbar wird. Die Agarose-Ethidiumbromid-Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen, mit einem Kamm für die Geltaschen versehen und ausgehärtet (etwa 20 Minuten). Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben (20 - 40 μl) wurden mit 5x- oder 10x Ladepuffer vermischt und

in Geltaschen überführt. Ebenso wurde ein 1 kb DNA-Marker mit 5 µl aufgetragen, für die Bestimmung der Fragmentgrößen. Je nach Gel- und Konstruktgröße wurde die Elektrophorese bei 80 - 120 V durchgeführt. Die Entwicklung der Gele fand mit einem Gel-Dokumentationssystem statt, bei der das Gel bei 325 nm bestrahlt und aufgenommen worden ist. Die zu analysierende DNA-Bande konnte anschließend aus dem Gel geschnitten und mittels *Gel Extraction Kit* nach Hersteller-Angaben aus dem Agarosegel extrahiert werden.

3.3.6 Restriktionsverdau der DNA

Für den DNA-Restriktionsverdau wurden zuvor entsprechende Restriktionsenzyme (Geneious Software) ausgewählt. Die Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaare innerhalb der doppelsträngigen DNA. Für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden pro µg DNA etwa 2 – 5 Einheiten Restriktionsenzym verwendet. Für den Verdau genomischer DNA wurden pro µg DNA bis zu 10 Einheiten Reaktionsenzym eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

x µl	DNA
2 µl	Reaktionspuffer
2-5 Einheiten/µg DNA	Restriktionsenzym
20 µl	dH ₂ O

3.3.6.1 Dephosphorylierung des Restriktionsansatzes

Für die Vermeidung einer Religation wurde eine Dephosphorylierung mit der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) durchgeführt. Dafür wurde 1 µl SAP zum Restriktionsansatz nach dem Verdau hinzugefügt und für eine weitere Stunde auf 37 °C inkubiert.

3.3.7 Ligation von DNA-Molekülen

Die Ligation von DNA-Molekülen wurde mittels T4-Ligase durchgeführt. Die Bakteriophage T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende linearer DNA-Moleküle. Der Reaktionsansatz wurde üN bei 4 °C inkubiert.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

3 µl	DNA-Fragment
1 µl	Vektor
2 µl	Ligase-Puffer
1 µl	T4-Ligase
20 µl	dH ₂ O

3.3.8 DNA-Transformation in *E. coli* Bakterien

Für die Transformation von DNA in *E. coli* Bakterien wurde ein CaCl₂-behandelter DH5α-Stamm verwendet. Nach dem Auftauen konnte der Ligationsansatz (etwa 10 µl) zu den Bakterien hinzugefügt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert werden. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden wurde die DNA in die Bakterien transformiert. Es wurden 500 µl LB-Medium

hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C im Schüttler bei 800 rpm inkubiert. Der Gesamtansatz wurde auf LB-Agar-Platten ausplattiert und üN bei 37 °C unter einer Antibiotikum-Selektion wachsen gelassen. Die transformierte DNA beinhaltet eine spezifische Antibiotikum-Resistenz. Entsprechend konnten nur Bakterien mit erfolgreicher DNA-Transformation auf den LB-Agar-Platten wachsen und Klone bilden.

3.3.8.1 Mini-Präp und Maxi-Präp

Nach einer erfolgreichen DNA-Transformation in *E. coli* konnten Bakterienkolonien auf den LB-Agar-Platten gepickt werden. In sterilen Reagenzgläsern wurde 2 ml LB-Medium mit Ampicillin vorgelegt und die Spitze mit dem gepickten *E. coli*-Klon hinzugefügt. Die Reagenzgläser wurden mit einem Korken verschlossen und üN bei 37 °C geschüttelt. Am Folgetag erfolgte die Mini-Präp:

1 ml Kultur in ein Eppendorf Tube überführen, zentrifugieren	5 Min, 4.500 rpm
Überstand wird verworfen, das Bakterienpellet weiter behandelt	
Zugabe des Resuspensionspuffers (RNase), resuspendieren	300 µl
Zugabe des Lysepuffers, schwenken	300 µl, 5 Min Inkubation, RT
Zugabe des Neutralisationspuffers, invertieren	300 µl, 30 Min Inkubation, 4 °C
Zentrifugation bei 4 °C	15 Min, 13.000 rpm
800 µl Überstand in ein neues Eppendorf Tube überführen	
Zugabe von Isopropanol	640 µl, 15 Min Inkubation, RT
Zentrifugation bei 4 °C	15 Min, 13.000 rpm
Überstand wird verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen	
Zentrifugation bei 4 °C	15 Min, 13.000 rpm
Ethanol wird verworfen und das Pellet getrocknet und in 20 µl dH ₂ O resuspendiert	

Die Maxi-Präp entspricht dem Prinzip der Mini-Präp, nur in größeren Maßstäben. Wie in 3.3.8 beschrieben wurden DH5α-Bakterien aufgetaut und mit 1 µl DNA (aus der Mini-Präp) injiziert. Es folgte die Inkubation auf Eis für 30 Minuten mit dem nachfolgenden Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden sowie die Zugabe von 500 µl LB-Medium mit der einstündigen Inkubation bei 37 °C und 800 rpm. In einem Erlenmeyerkolben wurden 100 ml LB-Medium mit Ampicillin vorgelegt. Die Bakterien-DNA-Suspension wurde vollständig zu den 100 ml LB-Medium hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am Folgetag wurde die Maxi-Präp durchgeführt.

100 ml Bakterienkultur auf zwei 50 ml Falcons aufteilen	
Zentrifugation	5 Min, 4.500 rpm
Überstand wird verworfen, das Bakterienpellet weiter behandelt	
Zugabe des Resuspensionspuffers (RNase), resuspendieren	12 ml
Zugabe des Lysepuffers, schwenken	12 ml, 5 Min Inkubation, RT
Zugabe des Neutralisationspuffers, invertieren	12 ml, 30 Min Inkubation, 4 °C
Filtrierungssäulen mit Äquilibrium-Puffer behandeln	20 ml
DNA-Lysat auf die Säulen auftragen und filtern	
Säulen mit Wasch-Puffer reinigen	32 ml
Säulen aus dem Filter entfernen	
DNA-Eluierung und auffangen in einem frischen 50 ml Falcon	15 ml Eluationspuffer

Zugabe von Isopropanol	11 ml
Zentrifugation bei 4 °C	60 Min, 4.500 rpm
Überstand wird verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen	
Zentrifugation bei 4 °C	20 Min, 4.500 rpm
Ethanol wird verworfen und das Pellet getrocknet und in 300 µl dH ₂ O resuspendiert	

Die gewonnene DNA wurde durch eine Sanger-Sequenzierung (BMFZ, HHU Düsseldorf) kontrolliert.

3.3.9 Site-Directed Mutagenese

Für die *Site-Directed* Mutagenese (mGBP7^{K51A}-Mutante) wurde das Kit QuickChange II XL *Site-Directed Mutagenesis* verwendet und nach Hersteller-Angaben durchgeführt. Es wurde folgender Reaktionsansatz angesetzt:

5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	DNA-Template (10 ng)
1 µl	forward Primer (125 ng)
1 µl	reversed Primer (125 ng)
1 µl	dNTP Mix
3 µl	QuickSolution
30 µl	dH ₂ O
1 µl	PfuUltra HF DNA Polymerase

Es folgte eine Polymerase-Kettenreaktion unter folgenden Konditionen:

1.	DNA Denaturierung	95 °C	1 Minute
2.	DNA Denaturierung	95 °C	50 Sekunden
3.	Primerhybridisierung	60 °C	50 Sekunden
4.	Polymerase-Verlängerung	68 °C	16 Minuten
Wiederholung der Schritte 2 bis 4		18 x	
5.	Polymerase-Verlängerung	68 °C	7 Minuten
6.	Ende	4 °C	∞

Anschließend wurde 1 µl Dpn I für den Abbau parentaler DNA zum PCR-Ansatz hinzugefügt, für eine Minute zentrifugiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Transformation in *E. coli*-Bakterien (Abschnitt 3.3.8).

3.3.10 CRISPR/CAS9 System

Für die Eliminierung des mGBP3-Gens in NIH3T3-Fibroblasten wurde das CRISPR/Cas9-System von IDT verwendet. Dabei wurde ein Ribonukleoproteinkomplex (RNP) aus einer Alt-R CRISPR-CAS9 guide RNA (crRNA:tracrRNA Duplex) und einer CAS9-Endonuklease gebildet und durch Elektroporation in die entsprechenden Zellen übertragen. Die NIH3T3-Fibroblasten wurden in einer niedrigen Passage verwendet und dünn ausgesät. Am Vortrag wurde das Medium erneuert. Am Versuchstag wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und das FKS vollständig entfernt. Es wurde ein

crRNA:tracrRNA Duplex nach Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 20 μl gebildet und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde der RNP-Komplex mit der Zugabe des CAS9-Enzyms (61 μM , 16,7 μl) angefertigt und mit PBS auf 50 μl aufgefüllt. Der RNP-Komplex inkubierte für 20 Minuten bei Raumtemperatur und wurde danach auf Eis gelagert. Für die Elektroporation wurden die Zellen trypsiniert, in PBS resuspendiert und zu einer Gesamtmenge von 1×10^6 Zellen in 75 μl PBS ausgezählt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Zu den Zellen wurden 20 μl des RNP-Komplexes und 5 μl Alt-R *Electroporation Enhancer* (96 μM) hinzugefügt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Kapazität von 975 μF und einer Spannung von 250 V für 0,2 Millisekunden. Anschließend wurden die elektroporierten Zellen in 2 ml frischem Medium aufgenommen und in einem Well einer 12-Well Platte überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 8 % CO_2 für 72 Stunden und eine anschließende Vereinzelnung auf 96-Well Platten. Aus den vereinzeln Zellen entwickelten sich homogene Zellkulturen, welche durch verschiedene Methoden analysiert wurden (RT-PCR, Western Blot, Sanger-Sequenzierung).

4. Ergebnisse

4.1. Die Rekrutierung und Lokalisation von mGBP7 mit dem obligat-intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii*

4.1.1 Versuchsaufbau: Infektionsanalysen mit *T. gondii*

Zu Beginn dieser Forschungsarbeit sollte die Rekrutierung und Lokalisation von mGBP7 mit dem obligat-intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* untersucht werden. Hierzu wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF Zellen) aus mGBP7-defizienten Mäusen verwendet, welche zuvor mittels *Gene-targeting* und homologer Rekombination durch Dr. C. Beuter-Gunia generiert worden sind (siehe Abbildung 4, Abschnitt 1.3.1). Die mGBP7^{-/-} Zellen wurden mit einem N-terminalen GFP-mGBP7 Fusionskonstrukt und gegebenenfalls mit mehreren mCherry-mGBP-Konstrukten lentiviral transduziert, selektiert und für die Experimente über einen Zeitraum von 16 Stunden mit IFN γ (100 U/ml) stimuliert. Anschließend erfolgten Infektionsanalysen mit *T. gondii*, wozu diese im Verhältnis 1:50 zu den ausgesäten MEF Zellen (10.000 Zellen pro Well/Deckgläschen/*Live Cell Imaging Dish*) hinzugefügt wurden. Anschließend erfolgte eine konfokal-mikroskopische Analyse. Für die mikroskopischen Analysen wurden zum einen *Live Cell Imaging Movies* mit lebenden Zellen und einer Wellenlängen-Anregung des GFP-Proteins mit 488 nm und eines mCherry-Konstruktes mit 633 nm durchgeführt, zum anderen wurden die Infektionsstudien mit fixierten Proben und mittels Airyscan Mikroskopie untersucht. Die Airyscan Mikroskopie bietet durch die Detektion einer höheren Photonenzahl mit 32 konzentrisch angeordneten Detektorelementen entsprechend einer virtuellen Lochblende (*pinhole*) von 0,2 AU (Airy Unit) bei einer gleichzeitigen Erhöhung des Signal-Rauschverhältnisses, eine erhöhte Auflösung. Auf diese Weise wird eine laterale Auflösung bis zu 140 nm erreicht (Huff, 2015; Muller und Enderlein, 2010; Sheppard et al., 2013; York et al., 2012). Das Detektionsvermögen der konventionellen Konfokalmikroskopie erreicht vergleichsweise eine Auflösungsgrenze von 240 nm. Für die Verwendung fixierter Proben wurden Saponin-enthaltende Permeabilisierungs-, Blockierungs- und Antikörperlösungen verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1) und für die *T. gondii*-Visualisierung ein primärer anti-SAG1 Antikörper genutzt (bindet an das *T. gondii*-Oberflächenantigen SAG1). Als sekundärer Antikörper wurde ein mit AlexaFluor633-gekoppelter Antikörper, der bei einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und mikroskopisch detektiert werden kann (siehe Abschnitt 2.1.2), eingesetzt. Für die Markierung der DNA wurde eine DAPI-Färbung angewendet. In Kooperation mit Dr. Viktoria Liss, Mitglied der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Hensel, Universität Osnabrück, wurde ein weiteres mikroskopisches Analyseverfahren angewendet, die CLEM-Mikroskopie. CLEM bezeichnet die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (*correlative light and electron microscopy*) und kombiniert zwei Mikroskopie-Technologien für eine hochauflösende Charakterisierung einer Probe (Razi und Tooze, 2009; Svitkina und Borisy, 1998). Die Probenvorbereitung wurde mit einer MEF-Zellzahl von 10.000 Zellen/MaTtek-Dish und einer 16-stündigen Stimulation mit IFN γ (100 U/ml) vor der *T. gondii*-Infektion durchgeführt. Entsprechende Fixierungs-, Blockierungs- und Wasch-Lösungen können aus Abschnitt 2.2.1 entnommen werden. Die lichtmikroskopischen Analysen

fanden mittels Konfokalmikroskopie und der Detektion der GFP-mGBP7 Fusionsproteine im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine Universität/Universitätsklinikum Düsseldorf und innerhalb dieser Promotionsarbeit statt. Die elektronenmikroskopische Probenaufbereitungen sowie die Elektronenmikroskopie wurden von Dr. Viktoria Liss in der Universität Osnabrück durchgeführt.

Ergebnisse: Infektionsanalysen mit *T. gondii*

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 MEF-Zelllinie nach entsprechenden Angaben in *Live Cell Imaging Dishes* ausgesät, mit IFN γ stimuliert und mit *T. gondii* (ME49) infiziert (siehe Abschnitt 3.1.4). Für diesen Versuch wurde in dieser Promotionsarbeit ein mCherry exprimierender Parasit (mCH-*T. gondii*) neu generiert, durch die Herstellung eines mCherry-Expressionsvektors für Toxoplasmen und mittels Elektroporation in den Parasiten transfiziert (siehe Abschnitt 3.1.6). Die Infektion des mCH-*T. gondii* und die Rekrutierung und Lokalisation des GFP-mGBP7 Fusionsproteins wurden durch Lebendzell-Aufnahmen (*Live Cell Imaging Movies*) analysiert. Dargestellt werden Aufnahmen zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten, das vollständige Video befindet sich auf dem beigefügten Datenträger (Datei 1).

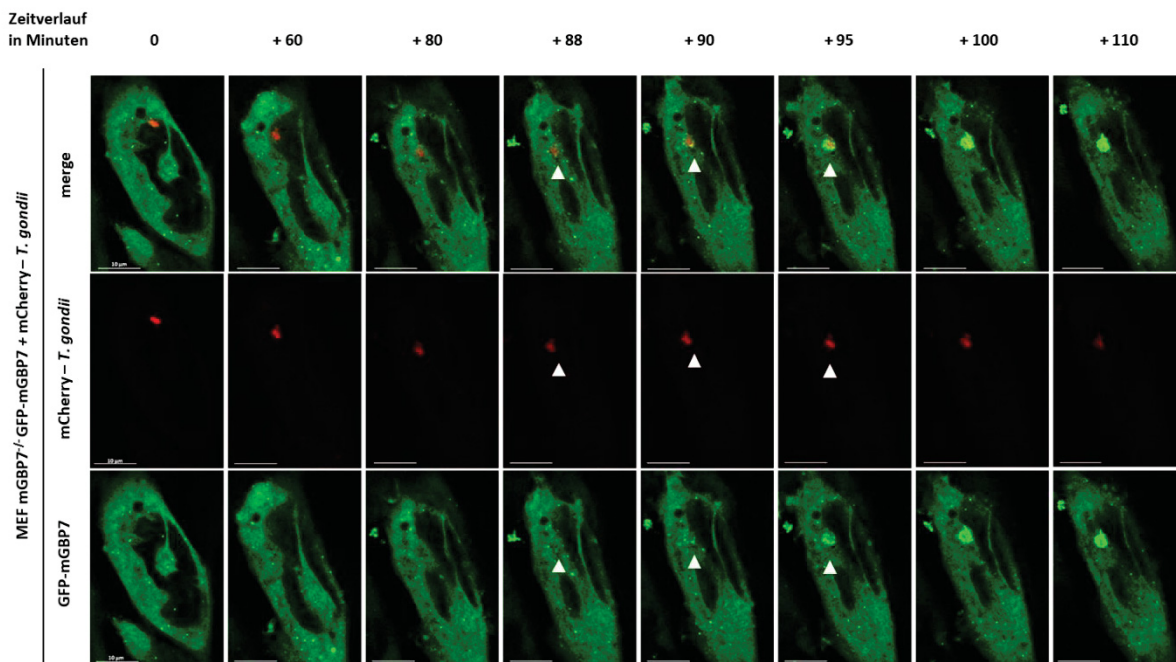


Abbildung 7: *Live Cell Imaging* der Interaktion zwischen GFP-mGBP7 und mCH-*T. gondii*. Die mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 (Grün) MEF-Zelllinie wurde mit IFN γ stimuliert und nachfolgend mit genetisch veränderten mCH-*T. gondii* Parasiten (Rot) infiziert. Gezeigt werden Aufnahmen zu den entsprechenden Zeitpunkten des Videos. Der Marker entspricht 10 μ m.

Die Ergebnisse aus der Abbildung 7 deuten darauf hin, dass nach circa 88 Minuten Beobachtungszeit die Invasion des mCH-*T. gondii* in die MEF-Zelle detektiert werden konnte. Dabei konnte eine zunehmende Dichte von GFP-mGBP7 um den Parasiten identifiziert werden, die im Verlauf der Beobachtungszeit immer deutlicher wurde (weißer Pfeil). Die Fusionsproteine akkumulierten nachhaltig und in großer Menge direkt an der *T. gondii*-PVM (nach 110 Minuten Beobachtungszeit). Vor der Infektion befand sich mGBP7 in VLS, verteilt im Zellzytosol. Nachfolgend wurden fixierte mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 MEF-Zellen mittels Airyscan Mikroskopie untersucht. Für diese Analysen

wurden keine mCH-*T. gondii* Parasiten verwendet, sondern eine *T. gondii*-Antikörperfärbung (SAG1) durchgeführt.

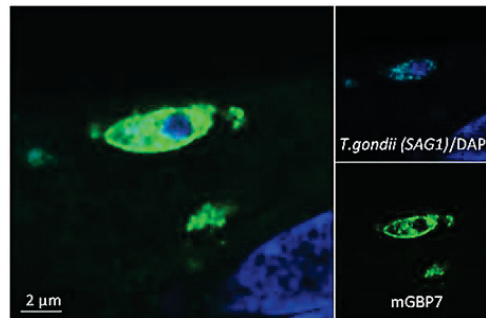


Abbildung 8: Airyscan Mikroskopie einer mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 (Grün) MEF-Zelle, infiziert mit *T. gondii* (Cyan: *T. gondii*-Antikörperfärbung, Blau: DAPI-Färbung). Die Zellen wurden 16 h vor der Infektion mit IFN γ stimuliert und 2 h nach der Infektion fixiert. Der Marker entspricht 2 μ m.

Bedingt durch die Detektion einer höheren Photonenzahl gegenüber der konventionellen konfokalen Mikroskopie, konnte mittels Airyscan Mikroskopie die mGBP7-Lokalisation an der PVM und an der Plasmamembran des *T. gondii* Parasiten (Cyan/Blau) analysiert werden. Die in Abbildung 8 dargestellte Airyscan Aufnahme zeigt, dass mGBP7 (Grün) in hoher Dichte an der PVM akkumulierte und diese penetrierte, sodass es ins Vakuolenlumen gelangen konnte und direkt an der *T. gondii*-Plasmamembran vorzufinden war. Somit konnte der Toxoplasmen-Schutzmechanismus PV von mGBP7 durchbrochen werden und war ebenfalls innerhalb des *T. gondii*-Parasiten detektierbar. Für eine weitere Charakterisierung der mGBP7 Rekrutierung und Lokalisation mit *T. gondii* wurden in Kooperation mit Dr. Viktoria Liss und Prof. Dr. Michael Hensel, Universität Osnabrück, die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) durchgeführt (siehe 3.1.5.4). Konfokal-Lichtmikroskopisch wurde eine zuvor bestimmte Region (ROI, *Region of Interest*) des Präparats mit einer PV ausgewählt und mit Hilfe eines Koordinatensystems auf den MatTek Dishes lokal eingeordnet, aufgenommen und anschließend fixiert. Das Präparat wurde mit den entsprechenden Fixierungs- und Blockierungspuffern behandelt (siehe 2.2.1) und für die weitere Verwendung an die Universität Osnabrück verschickt. Dort wurden die Probenaufbereitungen für die Elektronenmikroskopie und die elektronenmikroskopische Detektion der ROI durchgeführt. Bedingt durch die Weitergabe der lichtmikroskopischen Aufnahmen sowie die relevanten Koordinaten der ROI, konnte die lokale Einordnung von Dr. Viktoria Liss durchgeführt werden. Somit konnte eine PV-Region durch lichtmikroskopische Aufnahmen mittels GFP-gekoppelten mGBP7 und durch elektronenmikroskopische Aufnahmen im Nanometer-Bereich charakterisiert werden.

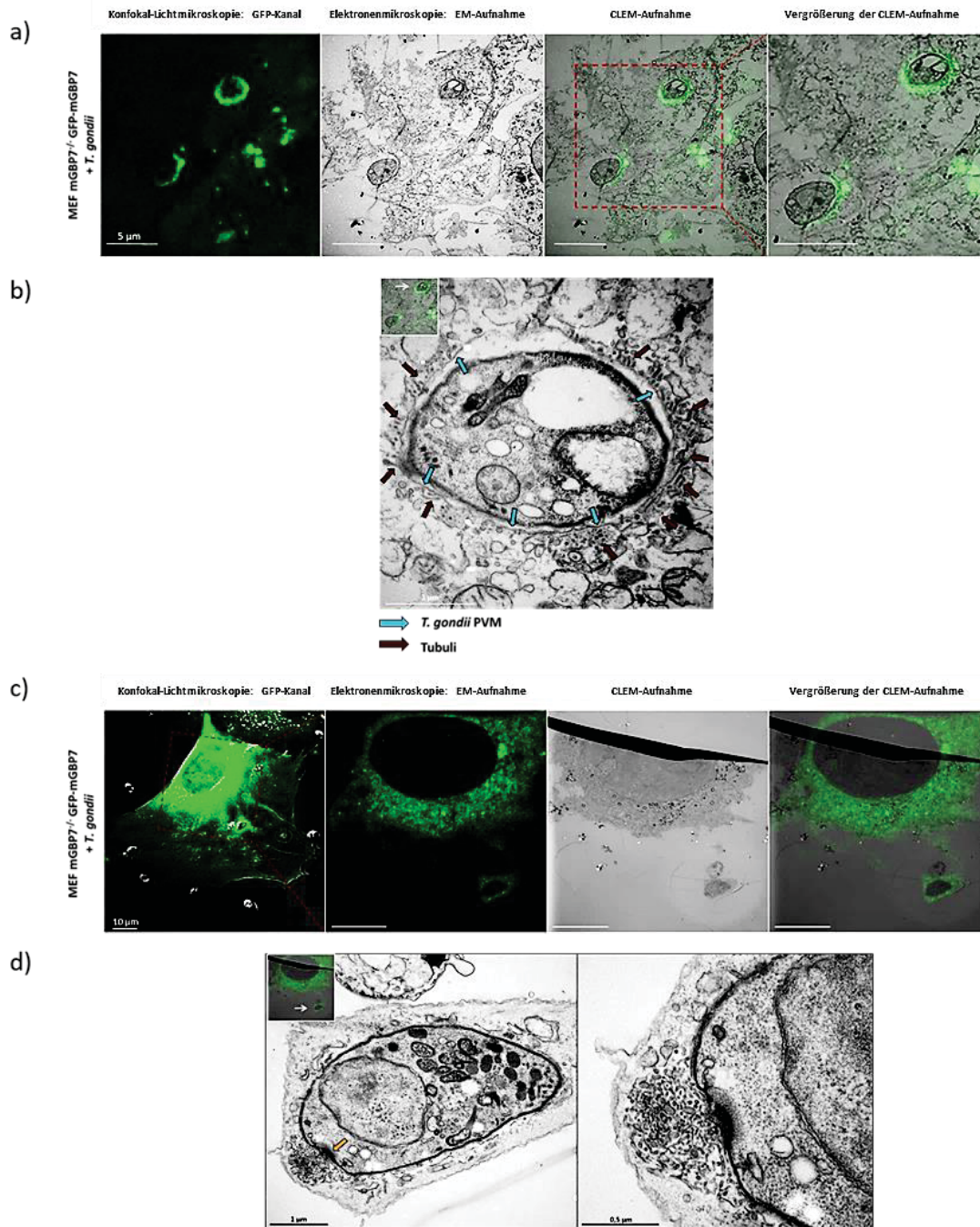


Abbildung 9: CLEM-Mikroskopie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Hensel, Universität Osnabrück. Dargestellt werden der GFP-Kanal der lichtmikroskopischen Aufnahme für die Detektion von GFP-mGBP7 in der ROI, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (EM) und die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) der entsprechenden ROI. Die Zellen wurden mit IFN γ stimuliert und 2 h nach der Infektion fixiert. a) ROI mit zwei *T. gondii*-Parasiten, die lichtmikroskopisch durch die dichte Assemblierung der GFP-mGBP7 Fusionsproteine an der PVM detektiert wurden. Die EM-Aufnahmen und CLEM-Aufnahmen zeigen, dass um die Parasiten tubuläre Proteinstrukturen akkumulierten, die mit den lichtmikroskopisch detektierten GFP-Signal korrelieren. Der Marker entspricht 5 μ m. b) Vergrößerung eines *T. gondii* Parasiten aus Abbildung 9a). Die blauen Pfeile zeigen die PVM des Parasiten, die roten Pfeile die Tubuli-Strukturen lokalisierend um die PVM, welche deckungsgleich mit dem lichtmikroskopisch aufgenommenen GFP-Signal sind. Der Marker entspricht 1 μ m. c) ROI mit einem *T. gondii*-Parasiten, welcher durch GFP-mGBP7 Akkumulation lichtmikroskopisch detektiert werden konnte. Die EM- und CLEM-Aufnahmen zeigen tubuläre Strukturen um die *T. gondii*-PVM. Der Marker entspricht 10 μ m. d) Vergrößerung des *T. gondii*-Parasiten aus Abbildung 9c). Der orangene Pfeil verdeutlicht eine Ansammlung tubulärer Strukturen an der *T. gondii*-Plasmamembran. Eine PVM kann nicht nachgewiesen werden. Der Marker entspricht auf der linken Aufnahme 1 μ m, auf der rechten Aufnahme 0,5 μ m.

Die Ergebnisse der CLEM-Mikroskopie in Abbildung 9 unterstützen die vorherigen Ergebnisse, dass das GFP-mGBP7 Fusionsprotein in großer Menge an die parasitäre PVM rekrutieren konnte. Anhand der CLEM-Aufnahmen im Nanometer-Bereich und der zuvor lichtmikroskopisch ausgewählten ROI, konnte die mGBP7-Lokalisation charakterisiert werden. Die Detektion von tubulären Strukturen, akkumulierend an der PVM und auch in hoher Ansammlung direkt an der Plasmamembran (9d), veranschaulichten aufgrund des GFP-Signals die mögliche Proteinstruktur der mGBP7-Fusionsproteine und womöglich weitere mGBP-Moleküle. Dieses Projekt wurde in dieser Promotion begonnen, benötigt allerdings noch weitere Untersuchungen in den nachfolgenden Forschungsarbeiten, um detaillierte Aussagen über die mGBP7-Lokalisation und gegebenenfalls Struktur treffen zu können.

Die Ergebnisse der Infektionsanalysen deuten darauf hin, dass das mGBP7 in großer Menge an die PVM des *T. gondii*-Parasiten akkumuliert und diese ebenfalls durchdringen kann. Dadurch ist es mGBP7 möglich, ins Vakuolenlumen zu gelangen und direkt an die *T. gondii*-Plasmamembran zu rekrutieren. Erste Nachforschungen bezüglich der Proteinstruktur lassen auf tubuläre Konformationen schließen, diese müssen allerdings in nachfolgenden Untersuchungen noch detaillierter analysiert werden.

4.1.2 Versuchsaufbau: Kolokalisationsanalysen von mGBP7 und weiteren Mitgliedern der mGBP-Familie

Bedingt durch die vorherigen Ergebnisse bezüglich der Rekrutierung und Lokalisation des GFP-mGBP7 Fusionsproteins an der PVM und Plasmamembran des Parasiten *T. gondii*, wurde nachfolgend die Kolokalisation von mGBP7 mit weiteren Mitgliedern der mGBP-Familie untersucht. Diesbezüglich wurden in dieser Forschungsarbeit doppelt transduzierte MEF-Zelllinien durch lentivirale Transduktion mit entsprechenden Expressionsvektoren hergestellt. Verwendet wurden hierzu mGBP7^{-/-}-GFP-mGBP7 MEFs, welche mit N-terminal mCherry-fusionierten mGBP2-, mGBP3- oder mGBP6-Expressionsvektoren transduziert wurden (siehe 3.1.3). Als Expressions-Nachweis der lentiviral transduzierten mGBPs wurden Western Blot Analysen mit primären anti-GFP- und anti-mCherry-Antikörpern und einem sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus-IgG, HRP-gekoppelt, durchgeführt (siehe 2.1.2). Die neu generierten MEF-Zelllinien wurden auf Deckgläschen oder *Live Cell Imaging Dishes* ausgesät (10.000 Zellen) und anschließend über einen Zeitraum von 16 Stunden mit IFN γ (100 U/ml) stimuliert. Wie bereits in Abschnitt 4.1.1. erläutert, wurden nachfolgende Infektionsanalysen mit *T. gondii* konfokal-mikroskopisch durch *Live Cell Imaging Movies* und Airyscan Mikroskopie durchgeführt. Des Weiteren wurden zwei hochauflösende Mikroskopie-Techniken in Kooperation mit dem *Center for Advanced Imaging (CAI, HHU Düsseldorf)* durchgeführt: Die SIM-Mikroskopie (*Structured Illumination Microscopy*), bei der die emittierte Fluoreszenz bedingt durch ein periodisches Raster im Anregungsstrahlengang erhöht und moduliert wird, erreicht eine Auflösungsgrenze circa bei 150 nm (Gustafsson, 2000; Gustafsson et al., 2008). Die STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*) erreicht die Auflösungsgrenzen bei circa 50 nm (Hell, 2009; Hell und Wichmann, 1994). Die nachfolgenden Kolokalisationsauswertungen wurden mittels ImarisBitplane Coloc-Kanal (ImarisColoc) und Pearson's Korrelationskoeffizient berechnet und visualisiert. Eine Kolokalisation beschreibt die räumliche Überlappung der

Fluoreszenzsignale von zwei oder mehreren verschiedenen Proteinen. Der ImarisColoc Kanal visualisiert diese Überlappung zweier Fluoreszenz-markierter Proteine, indem die kolokalisierenden Proteine als weiße Punkte dargestellt werden. Die bildgebende Einheit eines Voxels stellt das dreidimensionale Äquivalent eines Pixels dar. Ein Voxel ist in bildgebenden Aufnahmen ein Körper, welcher durch drei Koordinaten eines orthogonalen Achsensystems beschrieben wird. Für die Berechnung und Darstellung einer Protein-Kolokalisation werden Strahlungs-Grenzwerte der einzelnen Proteine analysiert. Dieser Grenzwert basiert auf einem festgelegten Algorithmus des *National Institutes of Health* (NIH) mit dem Ausschluss von nicht kolokalisierenden Fluoreszenzintensitäten (Bitplane ImarisColoc - ProductDetails). Der Korrelationskoeffizient wurde nach Karl Pearson auf *Live Cell Imaging Movies* der doppelt transduzierten Zelllinien angewendet (Pearson, 1909). Die Korrelation kann einen Wert zwischen -1 und +1 annehmen, wobei -1 die totale negative Korrelation darstellt und einen gegenseitigen Ausschluss beider Proteine verdeutlicht. Der +1 Wert zeigt eine totale positive Korrelation, bei der jedes Protein X und jedes Protein Y miteinander kolokalisieren. Der Wert 0 bedeutet, dass keine Korrelation zwischen den beiden fluoreszierenden Voxeln existiert.

Ergebnisse: Kolokalisationsanalyse von mGBP7 mit mGBP2

Das mGBP2-Protein wurde in vorherigen Forschungsarbeiten studiert (Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016; Kravets et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass mGBP2 an die *T. gondii*-PVM rekrutierte, diese durchdringen und anschließend direkt an der Plasmamembran des Parasiten akkumulieren konnte. Die wichtige Rolle von mGBP2 auf die *T. gondii*-Replikation konnte *in vivo* bei infizierten mGBP2-defizienten Mäusen anhand einer höheren Mortalitätsrate im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4, 1.3.1) (Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016; Kravets et al., 2012).

Die Western Blot Analyse der doppelt transduzierten mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 MEF-Zelllinie konnte die Expression beider lentiviral transduzierten Proteine bestätigen.

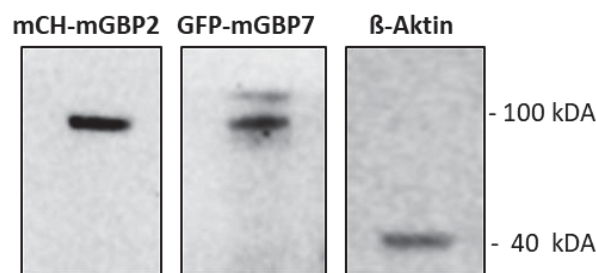


Abbildung 10: Western Blot des Zelllysats der mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 MEF-Zelllinie. Für die Detektion wurden anti-GFP- und anti-mCherry-Antikörper, sowie ein sekundärer Ziege-anti-Maus IgG, HRP-gekoppelter Antikörper verwendet (siehe 2.1.2). Die Fusionsproteine konnten mit einer theoretischen Größe von 99,9 kDa (GFP-mGBP7) und 99,8 kDa (mCherry-mGBP2) bei circa 100 kDa detektiert werden. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti- β -Aktin-Antikörper (40 kDa) durchgeführt.

Nach der Verifizierung der korrekten Expression von mGBP7 und mGBP2, wurden nachfolgend *Live Cell Imaging Movies* während einer *T. gondii*-Infektion aufgenommen und mittels ImarisColoc Kanal als auch durch die Pearson's Korrelations-Berechnung auf ihre Kolokalisation und Korrelation

analysiert. Gezeigt werden Aufnahmen eines Videos zu den entsprechenden Zeitpunkten, das vollständige Video befindet sich auf dem beigefügten Datenträger (Datei 2).

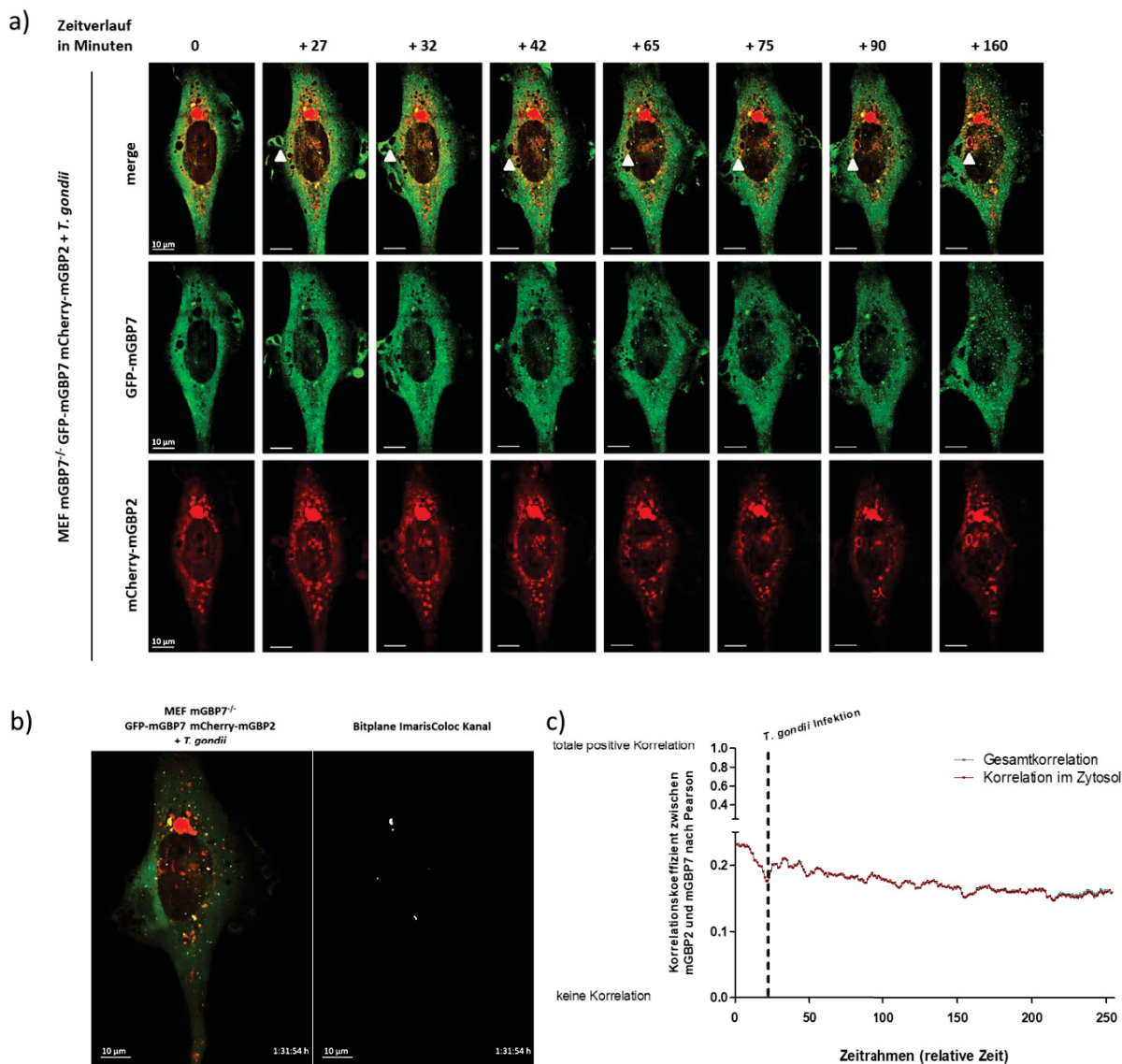


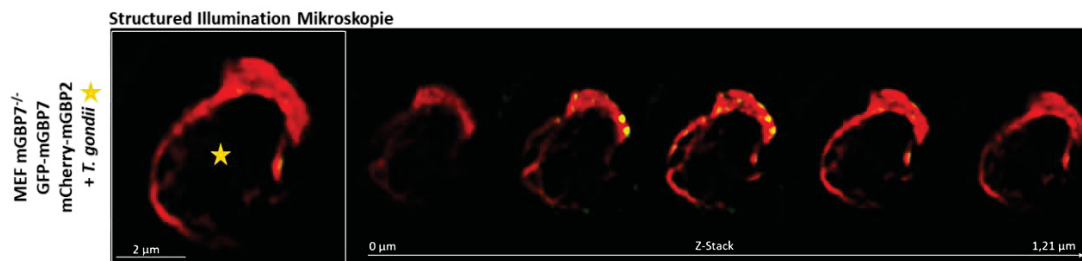
Abbildung 11: Korrelation und Kolokalisation der Fusionsproteine GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 während einer *T. gondii*-Infektion. a) *Live Cell Imaging* Aufnahmen von mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 MEFs während einer *T. gondii*-Infektion. Die Zelllinie wurde 16 Stunden vor der Infektion mit IFN γ stimuliert. Der Marker entspricht 10 μ m. b) Kolokalisationsanalyse durch den Bitplane ImarisColoc Kanal. Gezeigt wird links eine Aufnahme des *Live Cell Imaging* Movies aus 11a) nach 1:31:54 Stunden (h:min:sek). Rechts: Ausschnitt desselben Videos zur selben Zeit im ImarisColoc Kanal. Kolokalisierende Voxel beider Proteine werden als weiße Punkte dargestellt. Der Marker entspricht 10 μ m. c) Korrelationskoeffizient-Berechnung nach Pearson zwischen mGBP7 und mGBP2 für das *Live Cell Imaging* Video aus a). Die Korrelation wurde für jeden einzelnen Datenpunkt des gesamten Videos berechnet und auf einer Skala zwischen 0 (keine Korrelation) und +1 (totale positive Korrelation) dargestellt. Werte im Minusbereich und damit eine totale negative Korrelation sind nicht vorhanden und wurden nicht dargestellt. In Grün werden die Korrelationswerte der gesamten Zelle inklusive *T. gondii*-Akkumulation dargestellt. In Rot werden die Korrelationswerte der Proteine ausschließlich im Zytosol verdeutlicht.

Die Ergebnisse aus Abbildung 11 deuten darauf hin, dass zwischen den Fusionsproteinen GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP2 keine beziehungsweise nur eine sehr geringe Kolokalisation vorhanden war. Sowohl im dargestellten *Live Cell Imaging* Movie während einer *T. gondii*-Infektion, als auch die

Auswertung anhand des ImarisColoc Kanals deuten auf eine Abwesenheit kolokalisierender Voxel hin. Nach circa 42 Minuten Beobachtungszeit in 11a) konnte eine geringe Anzahl mCherry-mGBP2 Fusionsproteine an der *T. gondii*-PVM detektiert werden, welche im Verlauf der Aufnahmen anstieg. Nach 75 Minuten war eine vollständige Akkumulation von mCherry-mGBP2 an der PVM nachweisbar. Die GFP-mGBP7 Fusionsproteine konnten nur vereinzelt nach 90 Minuten Beobachtungszeit detektiert werden, deren Anzahl nur geringfügig im weiteren Verlauf zunahm. Anhand dieser Aufnahmen war keine Kolokalisation der Fusionsproteine ermittelbar, was anhand der in 11b) gezeigten Analyse bestätigt werden konnte. Die Korrelationsberechnung nach Pearson ergibt während der vollständigen *Live Cell Imaging* Aufnahme Korrelationskoeffizienten um 0,2. Dabei konnte in einem relativen Zeitrahmen erst nach 170 Datenpunkten ein geringer Unterschied zwischen der Gesamtkorrelation inklusive *T. gondii*-Akkumulation und der ausschließlichen Korrelation innerhalb des Zytosols detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Korrelation beider Proteine innerhalb des Zytosols als auch direkt an der *T. gondii*-PVM kaum vorhanden war. Es ist darauf hinzuweisen, dass das *Live Cell Imaging* Video einen Zeitausschnitt von circa 200 Minuten einer Infektion zeigt. Daraufhin musste das Video aufgrund der hohen Laserbelastung während der konfokal-mikroskopischen Aufnahmen beendet werden.

Für weitere Analysen bezüglich der mGBP2-mGBP7-Kolokalisation wurden die hochauflösenden Mikroskopie-Technologien SIM (*Structured Illumination* Mikroskopie) und STED (*Stimulated Emission Depletion* Mikroskopie) genutzt. Hierzu wurden Nano-Booster (siehe 2.1.3) für eine GFP- und mCherry-Signalverstärkung verwendet.

a)



b)

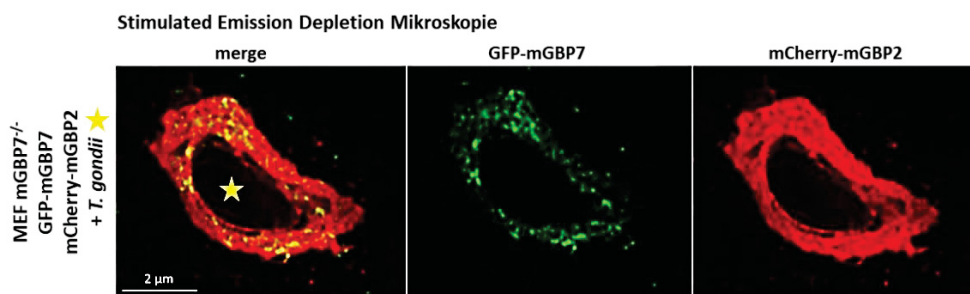


Abbildung 12: Hochauflösende mikroskopische Aufnahmen der mGBP2^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 MEF Zelllinie mit einer *T. gondii*-Infektion. Für die GFP- und mCherry-Signalverstärkung wurden entsprechende Nano-Booster verwendet, *T. gondii* wurde mit einem Stern gekennzeichnet. Die Zellen wurden 16 h vor der Infektion mit IFN γ stimuliert. a) SIM-Aufnahme eines *T. gondii*-Parasiten, 2 h nach der Infektion. Die Fusionsproteine mCherry-mGBP2 akkumulierten in hoher Zahl an die *T. gondii*-PVM, vereinzelt konnten GFP-mGBP7 Fusionsproteine innerhalb des Z-Stacks detektiert werden. Der Z-Stack zeigte die Verteilung der Fusionsproteine am Parasiten axial vom Startpunkt bis zum Endpunkt. Der Marker

entspricht 2 μm . b) STED-Aufnahme eines *T. gondii*-Parasiten, 6 h nach der Infektion. *T. gondii* war umlagert von mCherry-mGBP2 und GFP-mGBP7. Der Marker entspricht 2 μm .

Die Untersuchung der infizierten mGBP7^{-/-} mCherry-mGBP2 GFP-mGBP7 Zelllinie ermöglicht mittels der hochauflösenden Mikroskopie-Technologien SIM und STED die Verteilung der Proteine an einem *T. gondii*-Parasiten innerhalb der Zelle zu bestimmen. Die SIM-Probe wurde 2 h nach der *T. gondii*-Infektion fixiert und analysiert. Der Z-Stack wurde axial vom Startpunkt bis zum Endpunkt durch den Parasiten aufgenommen. Die axiale Aufnahme durch *T. gondii* verdeutlichte, dass mCherry-mGBP2-Proteine in einer signifikanten Dichte an der PVM des Parasiten akkumulierten und auch in der PV lokalisiert waren. Dabei konnte nur vereinzelt GFP-mGBP7 an der PVM detektiert werden. Ausschließlich in der mittleren Z-Ebene war eine größere Anzahl mGBP7-Fusionsproteine nachweisbar. Die STED-Aufnahme mit einer Auflösungsgrenze bei circa 50 nm zeigte eine *T. gondii*-Infektion der doppelt transduzierten mGBP7^{-/-} mCherry-mGBP2 GFP-mGBP7-Zelllinie, 6 h nach einer Infektion. Die mikroskopische Analyse ergab detaillierte Strukturen der mGBPs an der *T. gondii*-PVM und Plasmamembran. Sowohl eine direkte mCherry-mGBP2 Akkumulation als auch eine GFP-mGBP7 Akkumulation um die PVM waren erkennbar. Dabei erschien die lokale Verteilung der mGBP7 Fusionsproteine zum Beobachtungszeitpunkt (6 h nach der *T. gondii*-Infektion) innerhalb der mCherry-mGBP2 Fusionsproteine und nicht direkt an der *T. gondii*-PVM, erkennbar an der mCherry-mGBP2 Umrandung der PVM, welche so nicht für GFP-mGBP7 detektierbar war. Anhand dieser Aufnahme konnte gezeigt werden, dass nach einer deutlich längeren Infektionszeit von *T. gondii* (6 h statt 2 h) die mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine gemeinsam an die *T. gondii*-PVM akkumulieren können.

Rekrutierungs- und Akkumulationsanalysen von mGBP7 und mGBP2

Die vorherigen Ergebnisse (Abschnitt 4.1.1) verdeutlichten die Lokalisation von GFP-mGBP7 an der PVM und direkt an der Plasmamembran von *T. gondii*. Dieser Effekt konnte allerdings nicht in der doppelt transduzierten MEF-Zelllinie mit dem zusätzlichen Fusionsprotein mCherry-mGBP2 bestätigt beziehungsweise nur vermindert nachgewiesen werden (Abschnitt 4.1.2). Es gab die Vermutung, dass die Infektionsdauer und der entsprechende Analysezeitpunkt eine Rolle bezüglich der Fusionsprotein-Akkumulation spielt (Abbildung 12, Abschnitt 4.1.2). Entsprechend entstand die Frage, ob zwischen den mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteinen eine Interaktion bezüglich der *T. gondii*-Rekrutierung und Akkumulation besteht. In Folge dessen wurden weitere *Live Cell Imaging* Experimente mit dem Fokus auf die Kinetik und Dynamik der Rekrutierung von mGBP2 und mGBP7 an der *T. gondii*-PVM, durchgeführt.

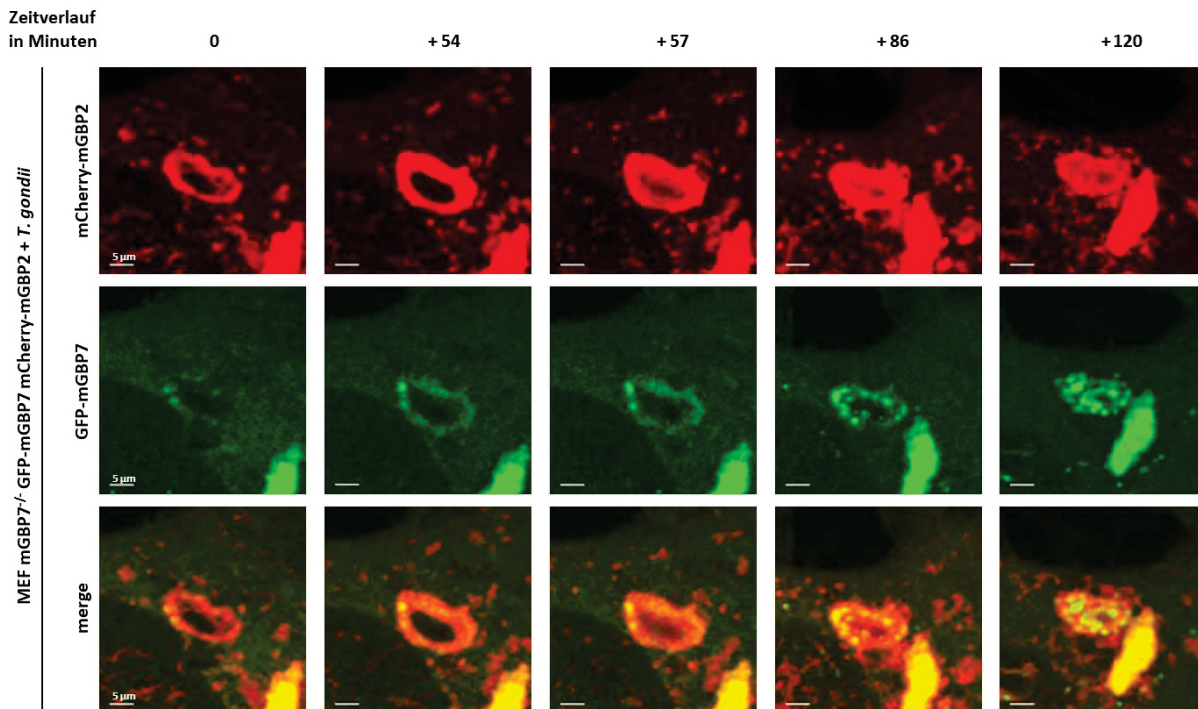


Abbildung 13: Dynamische und zeitabhängige Rekrutierung der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine. Gezeigt werden Aufnahmen eines *Live Cell Imaging Movies* einer *T. gondii* infizierten mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 MEF-Zelle. Die Zellen wurden 16 h vor der *T. gondii*-Infektion mit IFN γ stimuliert. Der Marker entspricht 5 μ m.

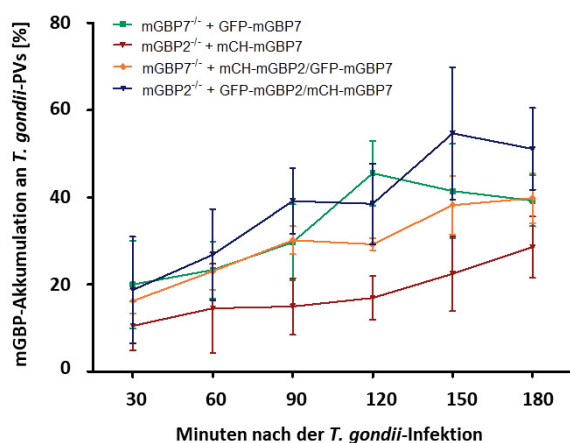
Die Ergebnisse aus Abbildung 13 zeigen, dass zwischen den mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteinen eine dynamische und zeitlich unterschiedliche Rekrutierung an den infizierenden *T. gondii*-Parasiten stattfand (das vollständige Video befindet sich auf dem beigefügten Datenträger, Datei 3). Zu Beginn der Beobachtungszeit konnte bereits mCherry-mGBP2 in großer Menge akkumulierend an der *T. gondii*-PVM nachgewiesen werden. Die Anzahl von GFP-mGBP7 beschränkte sich auf eine geringe Menge von mGBP7. Diese Aufnahmen entsprachen den vorherigen Untersuchungen aus Abschnitt 4.1.2 nach einer *T. gondii*-Infektionszeit von 2 h. Die Anzahl der mGBP7-Fusionsproteine, akkumulierend an der *T. gondii*-PVM, nahm nachweisbar im Verlauf der Aufnahme zu. Dies wurde deutlich anhand der Beobachtungszeitpunkte nach 57 Minuten, 86 Minuten und besonders nach 120 Minuten. Nach einer Beobachtungszeit ab 57 Minuten konnte zusätzlich die Anlagerung der mCherry-mGBP2 Fusionsproteine direkt an der parasitären Plasmamembran detektiert werden. Dies spricht für eine Permeabilisierung der *T. gondii*-PVM, wodurch mGBP2 Fusionsproteine ins Vakuolenlumen diffundieren und direkt an die *T. gondii*-Plasmamembran akkumulieren können. Nach 120 Minuten Beobachtungszeit konnten beide Proteine in einer ähnlichen Fluoreszenzstärke sowohl an der *T. gondii*-PVM als auch direkt an der Plasmamembran visualisiert werden. Zur weiteren Analyse der zeitlich-bedingten Lokalisation und Abhängigkeit der Rekrutierung von mGBP2 und mGBP7 wurden weitere MEF Zelllinien generiert. Dafür wurden mGBP2^{-/-} MEFS stabil mit Fluoreszenz-markierten mGBP7, oder mGBP2 + mGBP7 transduziert (Tabelle 1). Diese Zelllinien wurden mit *T. gondii* infiziert und nach jeweils 30 Minuten bis zu einer Zeitspanne von insgesamt drei Stunden fixiert. Es folgte eine anti-SAG1-Antikörperfärbung und die Auswertung am Konfokalmikroskop. Dabei wurden pro Zeitpunkt, pro Zelllinie und pro Ansatz (n = 3) jeweils

mindestens 100 *T. gondii*-Parasiten gezählt, um die Frequenz der mGBP2- oder mGBP7-positiven *T. gondii*-PVs zu ermitteln.

Tabelle 1: mGBP2^{-/-} oder mGBP7^{-/-} MEFs wurden mit entsprechenden GFP- oder mCherry-fusionierten mGBP-Konstrukten mittels lentiviraler Transduktion erzeugt.

MEF Zelllinie	mGBP2		mGBP7	
	endogen	transduziert	endogen	transduziert
mGBP7 ^{-/-} + mGBP7	+	-	-	+
mGBP2 ^{-/-} + mGBP7	-	-	+	+
mGBP7 ^{-/-} + mGBP2 + mGBP7	+	+	-	+
mGBP2 ^{-/-} + mGBP2 + mGBP7	-	+	+	+

a)



b)

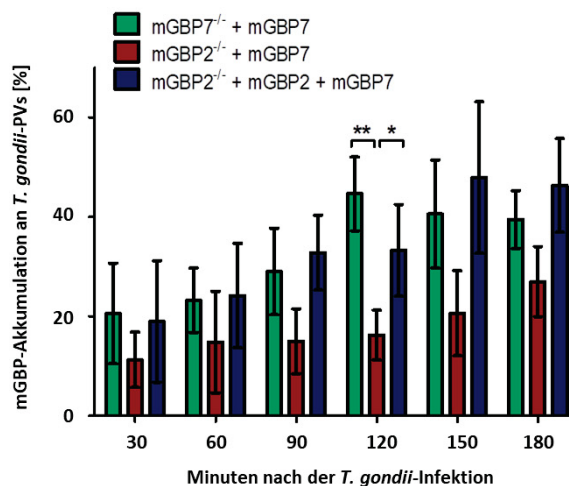


Abbildung 14: Darstellung der Rekrutierungs- und Akkumulationsanalyse der Fusionsproteine mGBP2 und mGBP7 an der PVM. Die Zelllinien wurden 16 Stunden vor der Infektion mit IFN γ stimuliert. a) Gesamtdarstellung aller untersuchten Zelllinien. In den Zelllinien mGBP7^{-/-} + mGBP7 und mGBP2^{-/-} + mGBP7 wurden alle mGBP7-positiven *T. gondii*-PVs gezählt und visualisiert. In den doppelt transduzierten Zelllinien wurden alle doppelt-positiven (mGBP2 + mGBP7) *T. gondii*-PVs gezählt und dargestellt. b) Detaillierte Darstellung der MEF-Zelllinien mGBP7^{-/-} + mGBP7 (Grün), mGBP2^{-/-} + mGBP7 (Rot) und mGBP2^{-/-} + mGBP2 + mGBP7 (Blau). Bei einem Vorhandensein endogener mGBP2-Proteine war eine erhöhte *T. gondii*-Akkumulation des transduzierten mGBP7-Fusionsprotein nachweisbar (Grün), im Vergleich zu einer Abwesenheit endogener mGBP2-Proteine (Rot). Dieser Unterschied zeigte nach 120 Minuten Infektionszeit einen statistisch signifikanten Effekt. Durch die Rekonstitution von mGBP2 (Blau), wurde dieser verminderte Akkumulationseffekt aufgehoben.

Die Gesamtdarstellung aller Ergebnisse in Abbildung 14a) der Rekrutierungs- und Akkumulationsanalyse zwischen den Fusionsproteinen mGBP2 und mGBP7 verdeutlichte die Unterschiede besonders zwischen mGBP2^{-/-} + mGBP7 (Rot) und mGBP7^{-/-} + mGBP7 (Grün). Um diese Unterschiede genauer zu identifizieren, wurde die Ergebnisdarstellung nachfolgend fokussiert. Die in Abbildung 14b) dargestellte Auswertung zeigt die Auswirkungen des Vorhandenseins beziehungsweise Nicht-Vorhandenseins endogener mGBP2-Proteine auf die Rekrutierung und Akkumulation der mGBP7-Fusionsproteine. Im Falle eines Nicht-Vorhandenseins endogener mGBP2-Proteine, konnte eine reduzierte Rekrutierung und Akkumulation der

mGBP7-Fusionsproteine detektiert werden, die nach 120 Minuten signifikant verschieden zu den Zellen mit endogener mGBP2-Expression waren. Im Allgemeinen betrug die Akkumulationsfrequenz der transduzierten mGBP7-Fusionsproteine in den mGBP2-defizienten Zelllinien (Rot) unter 20 %, mit Ausnahme nach 150 Minuten Infektionszeit mit einer Frequenz von 30 %. Im Vergleich betrug die Akkumulationsfrequenz der mGBP7-Fusionsproteine bei einem Vorhandensein endogener mGBP2-Proteine mindestens 20 % und über 40 % nach 120 Minuten. Bei einer Rekonstitution der mGBP2-Fusionsproteine in die mGBP2-defiziente MEF-Zelllinie (Blau) wurde der signifikant verminderte Akkumulationseffekt wieder aufgehoben. Nachfolgend wurden die doppelt transduzierten Zelllinien aus Tabelle 1 in einem weiteren Infektionsexperiment analysiert. Diese wurden erneut mit *T. gondii* infiziert und alle 30 Minuten bis zu einer Gesamtzeitspanne von drei Stunden fixiert und am Konfokalmikroskop analysiert. Die Auszählung der mGBP Fusionsprotein-positiven Parasiten erfolgte wie bereits beschrieben, pro Ansatz, Zeit und Zelllinie mit mindestens 100 Parasiten. Die gezählten mGBP-positiven *T. gondii*-Parasiten wurden in diesem Fall unterschieden zwischen mGBP7-positiven *T. gondii*, mGBP2-positiven *T. gondii* und mGBP2 + mGBP7-positiven *T. gondii*. Die Frequenzen der mGBP-positiven Parasiten wurden prozentual dargestellt

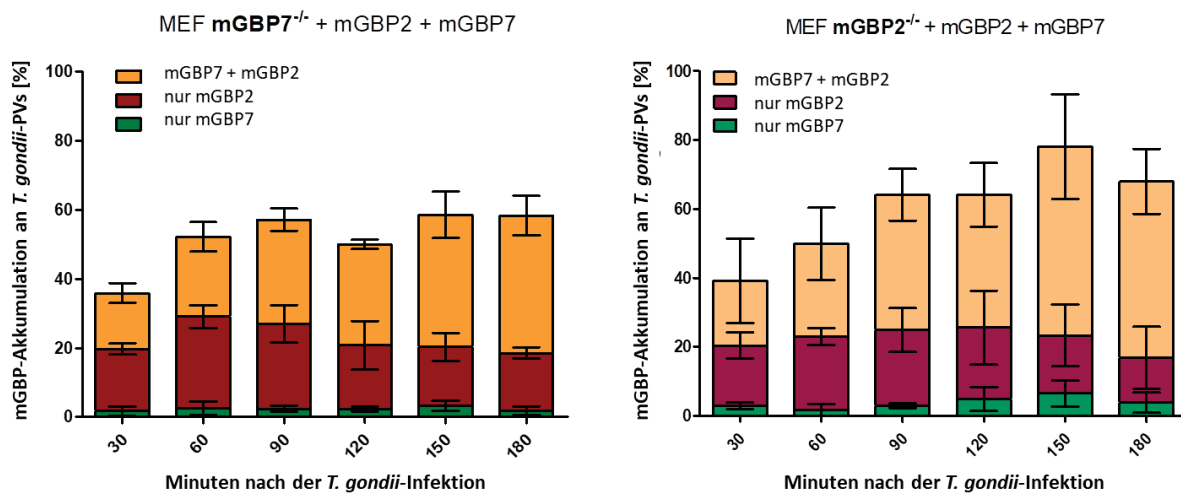


Abbildung 15: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine innerhalb der doppelt transduzierten MEF-Zelllinien. Dabei wurde zwischen mGBP7-positiven (Grün)-, mGBP2-positiven (Rot)- und doppelt positiven-*T. gondii*-Parasiten (Orange) unterschieden.

Die Ergebnisse in Abbildung 15 deuten darauf hin, dass bis zu 90 Minuten nach einer *T. gondii*-Infektion sowohl in mGBP2- als auch in mGBP7-defizienten MEF Zelllinien die Akkumulationsfrequenz von mGBP2-Fusionsproteinen (Rot) deutlich höher war im Vergleich zu mGBP7- (Grün) oder doppelt-positiven Parasiten (Orange). Nach 90 Minuten nahm der Wert der mGBP-Akkumulation beider Proteine zusammen zu, sodass dieser vergleichbar und teilweise höher zu den mGBP2-Akkumulationsfrequenzen alleine war. Die Akkumulation von den mGBP7-Fusionsproteinen war in beiden doppelt transduzierten Zelllinien sehr gering und verdeutlichte Höchstwerte von nur 5 %. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mGBP2 einen Einfluss auf die Rekrutierung und Akkumulation von mGBP7 an *T. gondii* ausübt.

Ergebnisse: Kolokalisationsanalyse von mGBP7 mit mGBP3

Der mGBP3-Genlocus befindet sich auf dem Chromosom 3 und beinhaltet, wie mGBP7, kein Isoprenylierungsmotiv. Die doppelt transduzierte mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3 MEF-Zelllinie wurde durch einen Western Blot auf die Expression der lentiviral transduzierten Proteine untersucht.

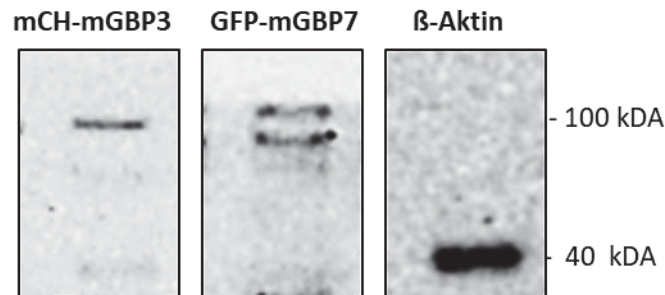


Abbildung 16: Western Blot des Zelllysats der mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3 MEF-Zelllinie. Für die Detektion wurden anti-GFP- und anti-mCherry-Antikörper, sowie ein sekundärer Ziege-anti-Maus IgG, HRP-gekoppelter Antikörper verwendet (siehe 2.1.2). Die Fusionsproteine konnten mit einer theoretischen Größe von 99,9 kDa (GFP-mGBP7) und 99,8 kDa (mCherry-mGBP3) bei circa 100 kDa detektiert werden. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti- β -Aktin Antikörper (40 kDa) durchgeführt.

Die Ergebnisse aus Abbildung 16 bestätigten die Expression der lentiviral transduzierten Fusionsproteine mGBP7 und mGBP3. Nachfolgend wurden *Live Cell Imaging Movies* während einer *T. gondii*-Infektion aufgenommen und mittels ImarisColoc Kanal als auch durch die Pearson's Korrelations-Berechnung analysiert. Gezeigt werden Aufnahmen des Videos zu den entsprechenden Zeitpunkten, das vollständige Video befindet sich auf dem beigefügten Datenträger (Datei 4).

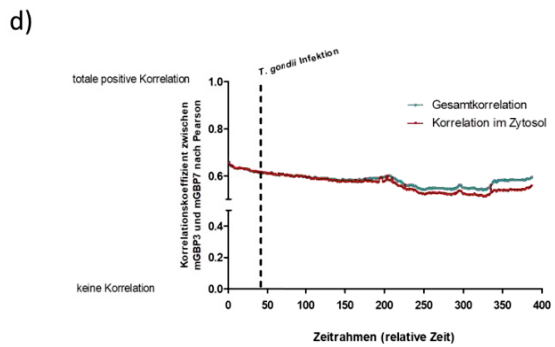
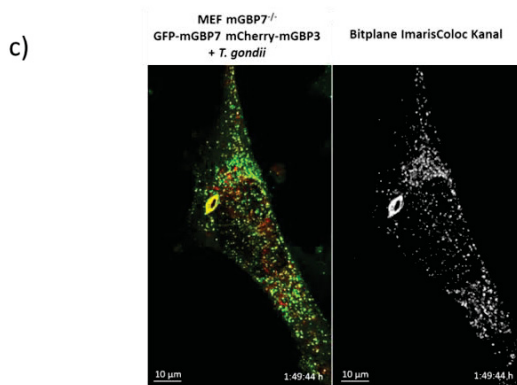
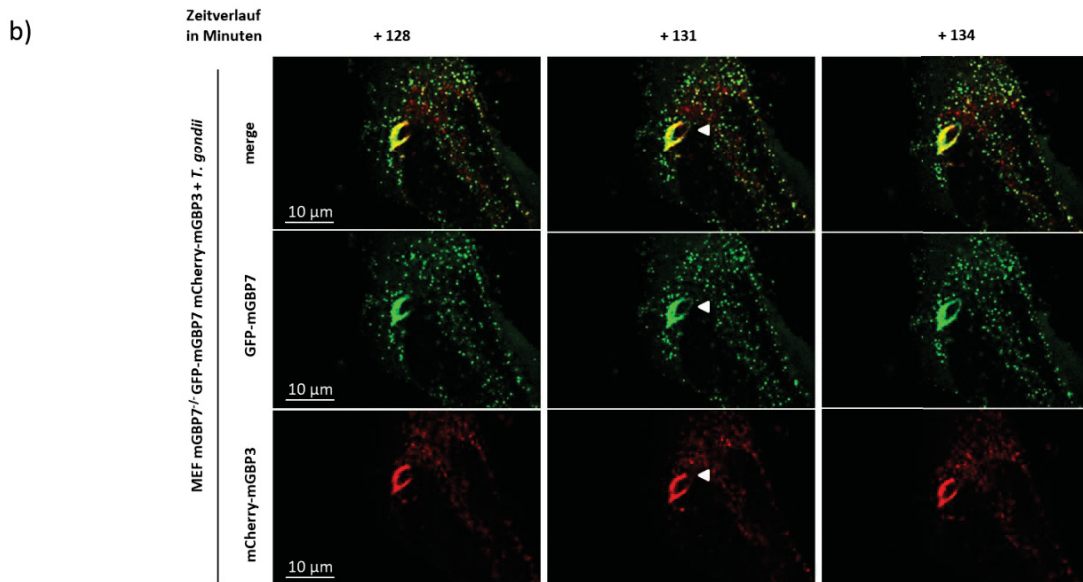
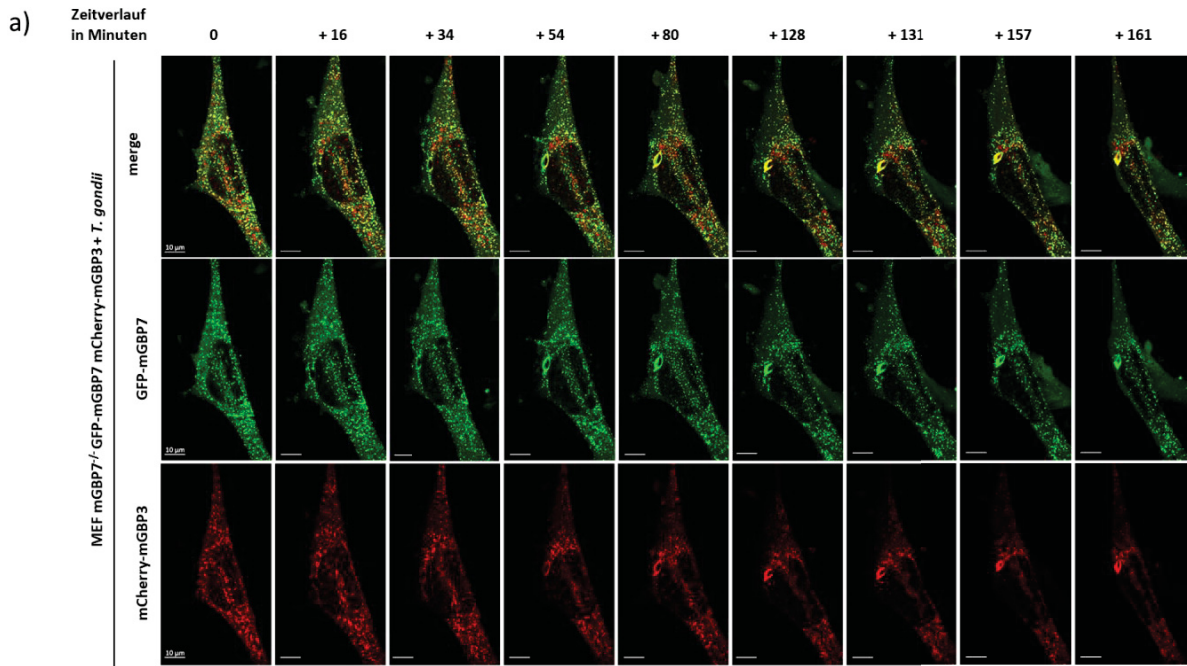


Abbildung 17: Kolokalisation und Korrelation der Fusionsproteine GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP3 während einer *T. gondii*-Infektion. a) *Live Cell Imaging* Aufnahmen von mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3 MEFs während einer *T. gondii*-Infektion. Die Zelllinie wurde 16 Stunden vor der Infektion mit IFN γ stimuliert. Der Marker entspricht 10 μ m. b) Vergrößerung der Aufnahmen für die Zeitpunkte 128 min bis 134 min. Die Akkumulation der mGBP-Fusionsproteine sowie

genaue Umrisse des Parasiten (weißer Pfeil) waren deutlich zu erkennen. Marker, 10 μm . c) Kolokalisationsanalyse durch den Bitplane ImarisColoc Kanal. Gezeigt wird links eine Aufnahme des *Live Cell Imaging Movies* aus 17a) nach 1:49:44 Stunden (h:min:sek). Rechts: Ausschnitt desselben Videos zur selben Zeit im ImarisColoc Kanal. Kolokalisierende Voxel beider Proteine werden als weiße Punkte dargestellt. Der Marker entspricht 10 μm . d) Korrelationskoeffizient-Berechnung nach Pearson zwischen mGBP7 und mGBP3 für das *Live Cell Imaging Video* aus 17a). Die Korrelation wurde für jeden einzelnen Datenpunkt des gesamten Videos berechnet und auf einer Skala zwischen 0 (keine Korrelation) und 1 (totale positive Korrelation) dargestellt. Werte im Minusbereich sind nicht vorhanden und wurden nicht dargestellt. In Grün werden die Korrelationswerte der gesamten Zelle inklusive *T. gondii*-Akkumulation dargestellt. In Rot werden die Korrelationswerte der Proteine ausschließlich im Zytosol verdeutlicht.

Die Ergebnisse aus Abbildung 17 deuten darauf hin, dass zwischen den Fusionsproteinen GFP-mGBP7 und mCherry-mGBP3 eine starke Kolokalisation vorhanden war. Sowohl im dargestellten *Live Cell Imaging Movie* während einer *T. gondii*-Infektion (17a), als auch die Auswertung anhand des ImarisColoc Kanals (17c) deuten auf ein Vorhandensein vieler kolokalisierender Voxel sowohl im Zellzytosol als auch direkt an der *T. gondii*-PVM hin. In den Aufnahmen des *Live Cell Imaging Videos* (das vollständige Video befindet sich auf dem beigefügten Datenträger, Datei 4) war bereits nach 16 Minuten Beobachtungszeit eine *T. gondii*-Infektion ersichtlich, welche eine schnelle und effektive Rekrutierung und Akkumulation beider Fusionsproteine zur Folge hatte. Die Akkumulation und auch Kolokalisation beider Proteine bestand bis zum Ende des Videos, welches nach 170 Minuten aufgrund der hohen Laserbelastung beendet wurde. In Abbildung 17b) wurde eine Vergrößerung mit dem Fokus auf *T. gondii* für den Zeitraum 128 – 134 Minuten nach Beobachtungsbeginn dargestellt. In dieser Abbildung war deutlich die Lokalisation der mGBPs als auch die Kontur der PVM erkennbar (weißer Pfeil). Die Korrelationsberechnung nach Pearson (17d) ergab während der vollständigen *Live Cell Imaging Aufnahme* einen Korrelationskoeffizienten der Gesamtkorrelation inklusive *T. gondii*-Akkumulation (Grün) über oder gleich 0,6. Damit war dieser Wert um ein dreifaches höher im Vergleich zu mGBP7 mit mGBP2. Die Gesamtkorrelation verdeutlichte geringe Unterschiede nach circa 150 Minuten im Vergleich zu der Korrelation im Zytosol (Rot). Dieser Effekt war auf die zunehmende Akkumulation beider mGBPs am Parasiten im Laufe der Aufnahme und folglich die Abnahme der mGBP-VLS im Zytosol zurückzuführen. Für weitere Analysen bezüglich der mGBP3-mGBP7-Kolokalisation wurden die hochauflösende Mikroskopie-Technologie STED genutzt. Wie bei der mGBP2-mGBP7-Analyse, wurden Nano-Booster (siehe 2.1.3) für eine GFP- und mCherry-Signalverstärkung verwendet und entsprechend auf die *T. gondii* anti-SAG1-Antikörperfärbung verzichtet. *T. gondii* wurde nachfolgend mit einem Stern gekennzeichnet.

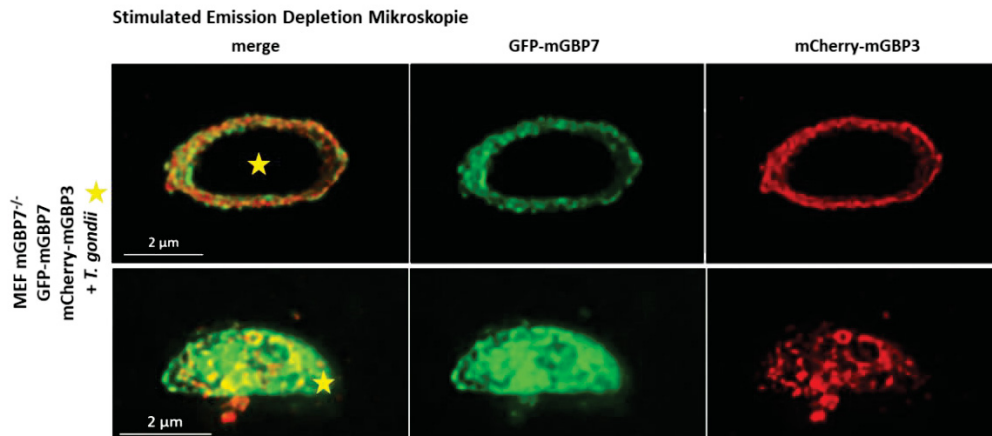


Abbildung 18: STED-Aufnahmen von *T. gondii*-Parasiten in mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3 MEF-Zellen. Die zwei mikroskopischen Aufnahmen zeigen die verschiedenen Akkumulationsstadien der mGBP-Proteine an den Parasiten. Oben: mGBPs akkumulierten an die PVM. Unten: mGBPs akkumulierten direkt an die Plasmamembran und im *T. gondii*-Parasiten. Die Zellen wurden 16 Stunden vor der *T. gondii*-Infektion mit IFN γ stimuliert. Der Marker entspricht 2 μ m.

Die Untersuchung der in Abbildung 18 dargestellten *T. gondii* infizierten mGBP7^{-/-} mCherry-mGBP3 und GFP-mGBP7 Zelllinie, verdeutlichte anhand der hochauflösenden Mikroskopie-Technologie STED die Verteilung der Fusionsproteine an einem *T. gondii*-Parasiten in zwei unterschiedlichen Akkumulationsstadien. In der oberen Aufnahme akkumulierten beide Fusionsproteine in einer ähnlichen Fluoreszenzstärke an die *T. gondii*-PVM. In der unteren Aufnahme befanden sich beide Fusionsproteine bereits im Vakuolenlumen und assemblierten direkt an die *T. gondii*-Plasmamembran sowie an den intraparasitären Membranen. Dieser Effekt verdeutlicht, dass eine Permeabilisierung der *T. gondii*-PVM stattfand, wodurch die Fusionsproteine in das Vakuolenlumen diffundieren konnten. Dabei wirkte das Akkumulationsmuster von GFP-mGBP7 flächendeckender und von mCherry-mGBP3 punktierter.

Zusammenfassend zeigen die Fusionsproteine der mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3 MEF-Zelllinie ein anderes Lokalisations- und Akkumulationsverhalten im Vergleich zu den Fusionsproteinen der mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP2 Zelllinie. Folglich wurden auch für die Fusionsproteine mGBP7 und mGBP3 die Rekrutierungs- und Akkumulationsanalysen durchgeführt.

Rekrutierungs- und Akkumulationsanalysen zwischen mGBP7 und mGBP3

Für die Rekrutierungs- und Akkumulationsanalyse zwischen den Fusionsproteinen mGBP7 und mGBP3 wurden erneut Zelllinien generiert. Da eine mGBP3-defiziente Zelllinie noch nicht bestand, wurde innerhalb dieser Promotionsarbeit zunächst das CRISPR/CAS9-System für NIH3T3-Fibroblasten aus der Maus angewendet (Jinek et al., 2012). Die CRISPR/CAS9-Methode (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ist ein molekularbiologisches Werkzeug, bestehend aus drei elementaren Bestandteilen: einer CRISPR-RNA (crRNA), die mit einem passenden DNA-Abschnitt assoziiert, einer tracr-RNA, die gemeinsam mit der crRNA eine Haarnadel-Struktur ausbildet und der Endonuklease CAS9 (*CRISPR-associated protein 9*), welches die beiden DNA-Stränge durchtrennt. Durch den DNA-Doppelstrangbruch können entweder neue DNA-Sequenzen in diese Lücke eingefügt werden (wie beispielsweise GFP) durch das Homologie-gerichtete Reparatursystem (*Homology-directed repair*, HDR), oder das nicht-homologe Enden-verbindende Reparatursystem

(*Non-homologous end joining*, NHEJ) wird aktiviert und es werden InDel gebildet (siehe 2.1.5 und 3.3.10). In diesem Fall wurde eine crRNA für das erste kodierende Exon der mGBP3-Sequenz verwendet, um diesen Abschnitt mit Hilfe des CAS9-Enzyms zu schneiden. In diesem Fall wurden die Sequenzen durch das NHEJ-System verbunden. Nachfolgend wurde das Ergebnis der CRISPR/CAS9-Mutation untersucht, in dem die mRNA-Expression des mGBP3-Gens und das Vorkommen beziehungsweise der Verlust des Proteins analysiert wurden.

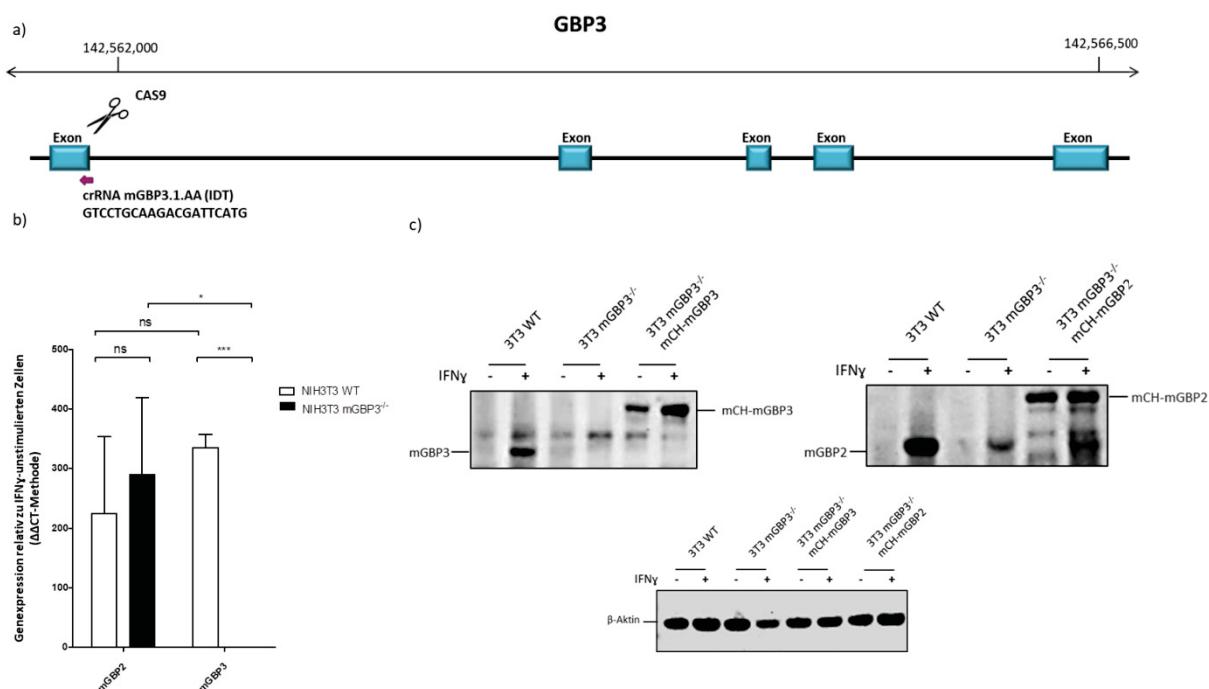


Abbildung 19: CRISPR/CAS9-Mutation von mGBP3. a) Grafische Darstellung der GBP3-Gensequenz mit Exons (Blau) auf dem dargestellten Genabschnitt. Die crRNA bindet an ein Exon der GBP3-Sequenz (rosa Pfeil). Die crRNA mGBP3.1.AA wurde käuflich von IDT erworben. Das Cas9-Enzym schneidet an dieser Stelle den DNA-Doppelstrang. b) Real-time PCR Analysen von mGBP2 und mGBP3 der NIH3T3 WT Zellen (Weiß) im Vergleich zu den CRISPR/CAS9-behandelten NIH3T3 mGBP3^{-/-} Zellen (Schwarz). Die Werte der Real-Time PCR verdeutlichen die relative Genexpression der IFN γ -stimulierten Zellen (16 h vor der Zellyse), im Vergleich zu den IFN γ -unstimulierten Zellen. c) Gezeigt werden Western Blot Experimente von NIH3T3 Wildtypzellen, mGBP3-defizienten Fibroblasten und mGBP3-defizienten Fibroblasten mit lentiviral transduziertem mCherry-mGBP3 beziehungsweise mCherry-mGBP2 mit und ohne IFN γ . Verwendet wurden ein anti-mGBP3- oder ein anti-mGBP2-Antikörper (siehe 2.2.1). In den NIH3T3 Wildtypzellen nach IFN γ -Stimulation war das mGBP3-Protein bei circa 73 kDa detektierbar, bei der mGBP3-defizienten Zelllinie jedoch nicht. Das transduzierte, mCherry-gekoppelte mGBP3 war in der mGBP3-defizienten Zelllinie sowohl mit als auch ohne IFN γ Stimulation bei circa 100 kDa nachweisbar. Transduzierte Proteine benötigen kein IFN γ als Expressionsfaktor, da diese konstitutiv unter der Kontrolle eines EF1 α Promotors exprimiert werden. Im Vergleich dazu konnten nach IFN γ -Stimulation mGBP2-Proteine bei circa 73 kDa in den NIH3T3 WT Zellen und mGBP3^{-/-} Zellen nachgewiesen werden. In der mGBP3^{-/-} mCherry-mGBP2 Zelllinie konnte nach IFN γ -Stimulation ebenfalls mGBP2, und unabhängig von IFN γ auch das transduzierte mCherry-mGBP2-Protein, nachgewiesen werden. Die Ladekontrolle wurde mittels anti- β -Aktin-Antikörper für alle Zelllinien bei circa 40 kDa nachgewiesen.

Die relative Genexpression von mGBP2 und mGBP3 der NIH3T3 Wildtypzellen sowie von den CRISPR/CAS9-behandelten NIH3T3 mGBP3^{-/-} Zellen wurden mittels Real-Time PCR durch die $\Delta\Delta$ CT-Methode quantifiziert. Die CT-Werte (*cycle threshold*, Schwellenwertzyklus) der IFN γ stimulierten und unstimulierten Zellen wurden dabei verglichen, welche das relative Maß der Genexpression verdeutlichten (Livak und Schmittgen, 2001). Es wurde ersichtlich, dass die

mGBP2-Expression der Wildtypzellen sich nicht von der Expressionsrate der mGBP3-defizienten Zellen unterschied. Die mGBP3-Expressionsrate der NIH3T3 mGBP3^{-/-} Zellen war mit einem Wert von 0,000000015 signifikant reduziert (19b). Anhand dieser Daten ist von einer fehlenden mGBP3-mRNA-Expression in den mGBP3-defizienten Fibroblasten und damit von einer erfolgreichen Inaktivierung des mGBP3-Lokus auszugehen. Die Protein-Expression der Zelllinien wurde mittels Western Blot Experimenten untersucht. Hierfür wurden die Wildtyp NIH3T3 Zellen mit den mGBP3-defizienten Zellen, den mGBP3-defizienten Zellen mit lentiviral transduziertem mCherry-mGBP3 und mCherry-mGBP2 nach IFN γ -Stimulation verglichen (19c). Verwendet wurden spezifische Antiseren gegen mGBP3, beziehungsweise mGBP2 (siehe 2.1.2). Die Western Blot Experimente ergaben, dass die Expression des endogenen mGBP3-Proteins in den CRISPR/CAS9-behandelten NIH3T3 mGBP3^{-/-} Zellen nicht mehr vorhanden war. Diese mGBP3-defiziente Zelllinie wurde nachfolgend für die Generierung weiterer Zelllinien mit lentiviral transduzierten Vektoren verwendet (Tabelle 2). Diese Zelllinien wurden darauffolgend mit den MEF mGBP7-defizienten, lentiviral transduzierten Zelllinien (Tabelle 3) in Bezug auf die dynamische Protein-Rekrutierung während einer *T. gondii*-Infektion verglichen.

Tabelle 2: NIH3T3 mGBP3^{-/-} Zelllinien mit lentiviral transduzierten, fluoreszierenden mGBP-Proteinen

NIH3T3 Zelllinie	mGBP3		mGBP7	
	endogen	transduziert	endogen	transduziert
mGBP3 ^{-/-} + mGBP7	-	-	+	+
mGBP3 ^{-/-} + mGBP3	-	+	+	-
mGBP3 ^{-/-} + mGBP3 + mGBP7	-	+	+	+

Tabelle 3: MEF mGBP7^{-/-} Zelllinien mit lentiviral transduzierten, fluoreszierenden mGBP-Proteinen

MEF Zelllinie	mGBP3		mGBP7	
	endogen	transduziert	endogen	transduziert
mGBP7 ^{-/-} + mGBP7	+	-	-	+
mGBP7 ^{-/-} + mGBP3	+	+	-	-
mGBP7 ^{-/-} + mGBP3 + mGBP7	+	+	-	+

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden analog zu den Rekrutierungs- und Akkumulationsanalysen von mGBP7 mit mGBP2 durchgeführt. Die mGBP3-mGBP7 Zelllinien aus Tabelle 2 und Tabelle 3 wurden mit *T. gondii* infiziert, nach jeweils 30 Minuten bis zu einer Gesamtzeitspanne von 3 Stunden fixiert und mit einem anti-SAG1-Antikörper gefärbt. Die Akkumulation der fluoreszierenden Proteine an den Parasiten wurde am Konfokalmikroskop analysiert und ausgewertet.

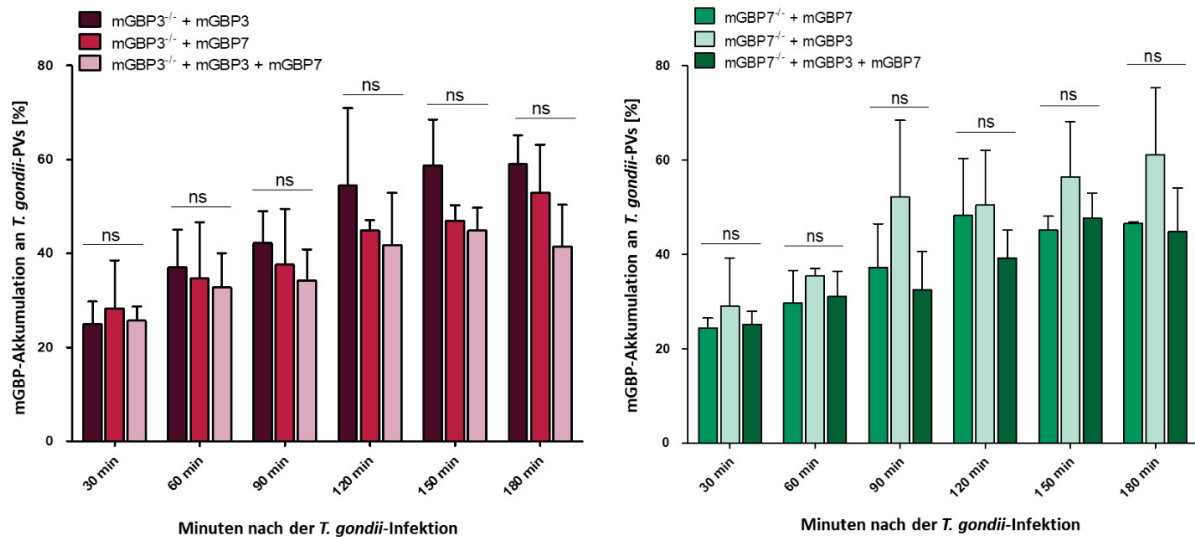


Abbildung 20: Darstellung der mGBP-positiven *T. gondii*-PVs der lentiviral transduzierten NIH3T3-Zelllinien aus Tabelle 2 (Rot, linke Abbildung) und der lentiviral transduzierten MEF-Zelllinien aus Tabelle 3 (Grün, rechte Abbildung). Gezählt wurden mGBP3-positive *T. gondii*-PVs der Zelllinien mGBP3^{-/-} + mGBP3 und mGBP7^{-/-} + mGBP3, sowie mGBP7-positive *T. gondii*-PVs bei den Zelllinien mGBP3^{-/-} + mGBP7 und mGBP7^{-/-} + mGBP7 und doppelt positive *T. gondii*-PVs (mGBP3 + mGBP7) bei den doppelt transduzierten Zelllinien. Zwischen den verschiedenen Zelllinien gab es keinen signifikanten Unterschied bei der Akkumulationsfrequenz der fluoreszierenden mGBPs an der *T. gondii*-PVM in der Gesamtzeitspanne von drei Stunden.

Die Analyse der neu generierten NIH3T3 mGBP3-defizienten Zelllinien (siehe Abbildung 20, Rot, linker Graph) und MEF mGBP7-defizienten Zelllinien (siehe Abbildung 20, Grün, rechter Graph) mit lentiviral transduzierten mGBPs ergab eine vergleichbare dynamische Rekrutierungs- und Akkumulationsfrequenz der jeweiligen Fluoreszenz-markierten mGBPs. Die Ergebnisse dieser Auswertung lassen schließen, dass eine gegenseitige Beeinflussung der Proteine im Bezug auf die PV-Rekrutierung nicht vorhanden ist. Allerdings müssen die Ergebnisse aus Abbildung 20 mit Vorsicht betrachtet werden, da es sich um zwei verschiedene Parental-Zelllinien (mGBP7^{-/-} MEF und mGBP3^{-/-} NIH3T3) handelt. Nachfolgend wurden die doppelt transduzierte NIH3T3 mGBP3^{-/-} Zelllinie mit den transduzierten Fusionsproteinen mGBP3 und mGBP7 sowie die doppelt transduzierte MEF Zelllinie mGBP7^{-/-} mit mGBP3 und mGBP7 untersucht. Dabei wurden pro Ansatz, Zeit und Zelllinie mindestens 100 Parasiten gezählt. Die gezählten mGBP-positiven Parasiten wurden nach mGBP7-positiven, mGBP3-positiven und mGBP7 + mGBP3-positiven *T. gondii*-Parasiten eingeteilt. Die Frequenzen der mGBP-positiven Parasiten wurden prozentual dargestellt.

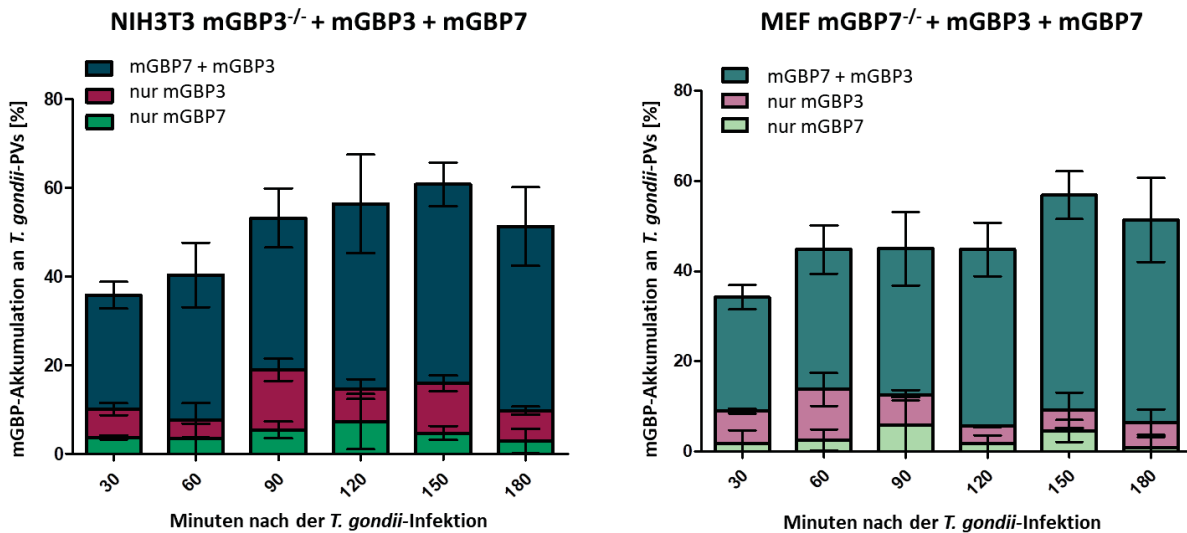


Abbildung 21: Analyse der Rekrutierung und Akkumulation der mGBP3- und mGBP7-Fusionsproteine innerhalb der doppelt transduzierten mGBP3^{-/-} NIH3T3- und mGBP7^{-/-} MEF-Zelllinien. Dabei wurde zwischen mGBP7-positiven (Grün)-, mGBP3-positiven (Rot/Magenta)- und doppelt positiven-*T. gondii*-PV (Petrol) unterschieden. Bereits 30 Minuten nach der *T. gondii*-Infektion war die Akkumulationsfrequenz beider Proteine zusammen am Parasiten deutlich höher als die Anzahl der Parasiten, die nur von mGBP3 oder nur von mGBP7 eingeschlossen wurden.

Die Analyse aus Abbildung 21 zeigte, dass anders als bei den Fusionsproteinen mGBP7 und mGBP2, von Beginn an die gemeinsame Akkumulation der mGBP3- und mGBP7-Fusionsproteine an der *T. gondii*-PVM höher als die Akkumulation der einzelnen Werte war. Dieses Ergebnis unterstützt vorherige Auswertungen, bei denen eine Kolokalisation und Korrelation dieser beiden Proteine, besonders an der *T. gondii*-PVM, nachgewiesen werden konnte. Die nachfolgenden Airyscan Aufnahmen der mGBP3^{-/-} NIH3T3 Zellen und der mGBP7^{-/-} MEF-Zellen mit den transduzierten mGBPs (mGBP3/mGBP7) zeigten zum einen die Kolokalisation beider Proteine an der *T. gondii*-PVM und zum anderen, dass dennoch die Rekrutierung von mGBP3 oder mGBP7 nicht voneinander abhängig war.

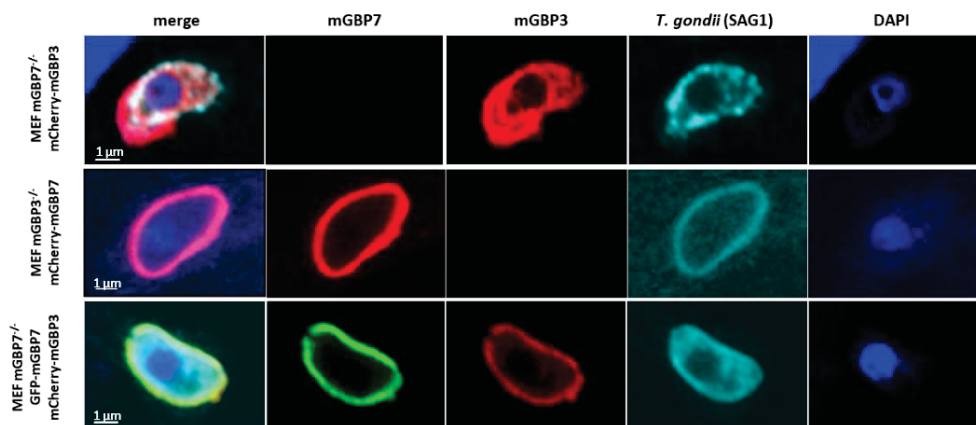


Abbildung 22: Airyscan Aufnahmen der MEF mGBP7^{-/-} mCherry-mGBP3 Zelllinie, der NIH3T3 mGBP3^{-/-} mCherry-mGBP7 Zelllinie und der doppelt transduzierten MEF Zelllinie mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP3. Für die *T. gondii*-Färbung wurde der anti-SAG1-Antikörper (Cyan) mit dem sekundären Ziege-anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt, und für die DNA-Färbung DAPI (Blau) verwendet. Marker, 1 µm.

Ergebnisse: Kolokalisationsanalyse von mGBP7 mit mGBP6

Der mGBP6-Genlocus befindet sich, anders als bei mGBP7, auf dem Chromosom 5. Das mGBP6 Protein beinhaltet kein Isoprenylierungsmotiv. Die doppelt transduzierte mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP6 MEF-Zelllinie wurde durch einen Western Blot auf die Expression der lentiviral transduzierten Proteine untersucht.

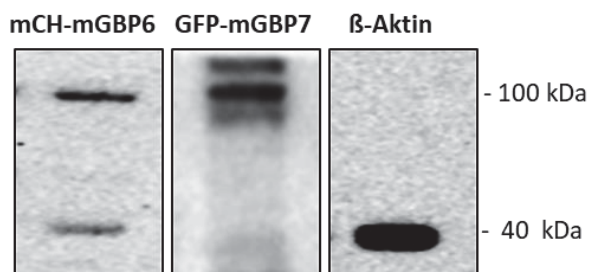
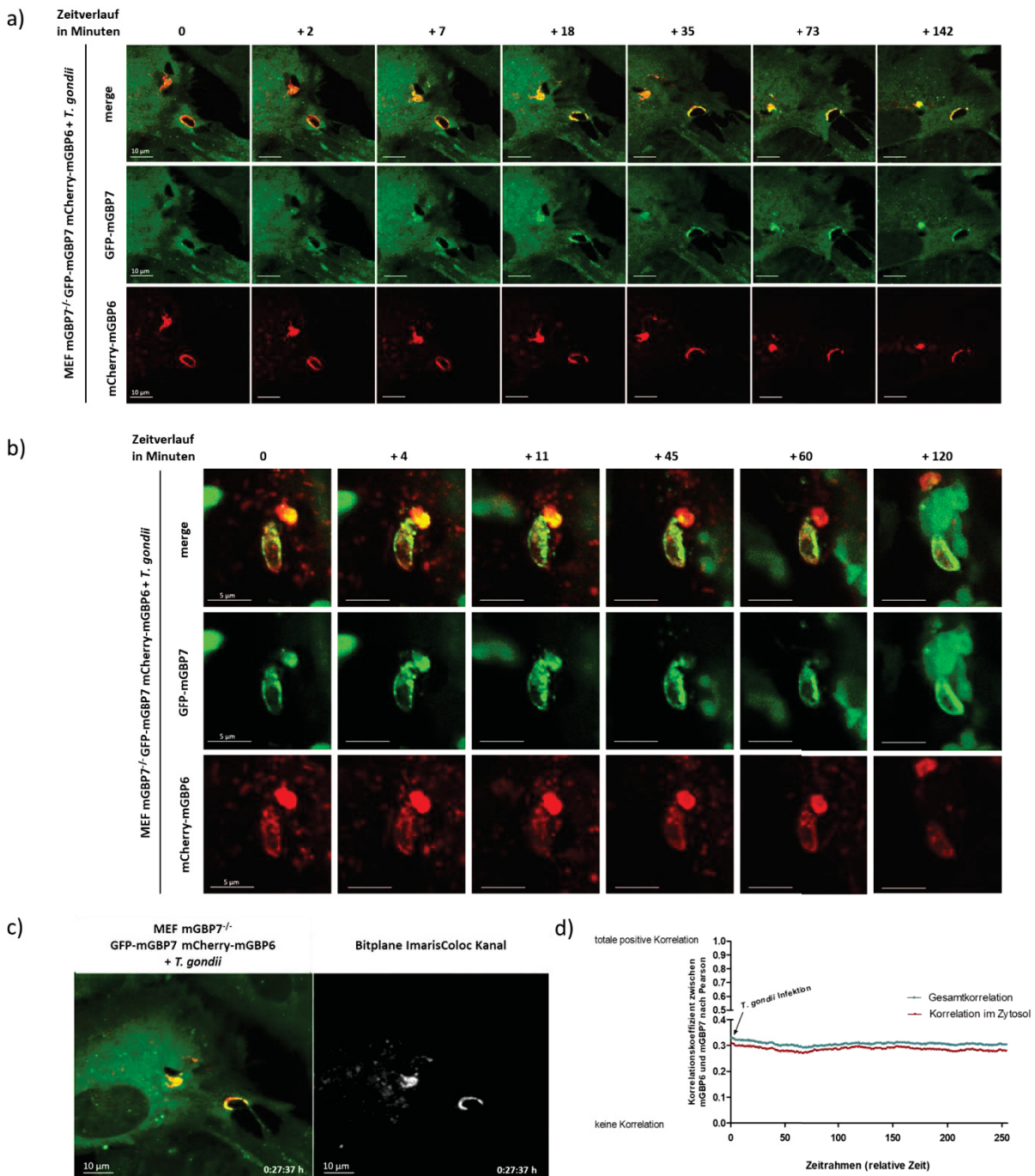


Abbildung 23: Western Blot des Zelllysats der mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP6 MEF-Zelllinie. Für die Detektion wurden anti-GFP- und anti-mCherry-Antikörper, sowie ein sekundärer Ziege-anti-Maus IgG, HRP-gekoppelter Antikörper verwendet (siehe 2.1.2). Die Fusionsproteine konnten mit einer theoretischen Größe von 99,9 kDa (GFP-mGBP7) und 99,8 kDa (mCherry-mGBP6) bei circa 100 kDa detektiert werden. Die Ladekontrolle wurde mit einem anti-β-Aktin-Antikörper (40 kDa) durchgeführt.

Die Western Blot Analyse zeigte die Expression beider lentiviral transduzierter Proteine in der neu generierten MEF-Zelllinie. Nachfolgend wurden *Live Cell Imaging Movies* während einer *T. gondii*-Infektion aufgenommen, sowie Kolokalisationsanalysen mittels ImarisColoc- und Korrelations-Berechnungen nach Pearson durchgeführt.



Die Ergebnisse aus Abbildung 24 zeigen Aufnahmen aus zwei *Live Cell Imaging* Videos (24a) und 24b)) (die vollständigen Videos befindet sich auf dem beigefügten Datenträger, Datei 5 und Datei 6) der mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP6 MEF-Zelllinie, die zwei unterschiedliche Akkumulationsstadien der mGBPs darstellen. In Abbildung 24a) akkumulierten beide Fusionsproteine an den *T. gondii*-PVMs. Die Kolokalisation der Fusionsproteine konnte nicht in VLS im Zellzytosol beobachtet werden. Zwischen Minute 73 und 142 waren keine Veränderungen detektierbar. Die Aufnahme wurde kurz darauf bedingt durch die hohe Laserstrahlung abgebrochen. Das *Live Cell Imaging* Video 24b) zeigt einen *T. gondii*-Parasiten, welcher bereits von den Fusionsproteinen mGBP7 und mGBP6 eingeschlossen wurde. Nach 120 Minuten Beobachtungszeit waren beide Proteine sichtbar an der Plasmamembran des Parasiten akkumuliert. Der ImarisColoc Kanal (24c) wurde auf das *Live Cell Imaging* Video von 24a) angewendet. An den *T. gondii*-PVMs waren deutliche Kolokalisationseffekte der Fusionsproteine nachweisbar. Der Pearson's Korrelationskoeffizient 24d) für die Gesamtkorrelation der mGBP6/mGBP7 Proteine in der Zelle (Grün), als auch für die Korrelation nur im Zytosol (Rot) von GFP-mGBP7 mit mCherry-mGBP6 befand sich etwa bei 0,35 und zeigte damit einen höheren Wert als GFP-mGBP7 mit mCherry-mGBP2 (ungefähr 0,2), aber einen deutlich niedrigeren Wert im Vergleich zu GFP-mGBP7 mit mCherry-mGBP3 (ungefähr 0,6). Die Gesamtkorrelation inklusive *T. gondii*-Akkumulation betrug nur einen minimal höheren Wert (Grün). Anhand dieser Ergebnisse und im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen mGBPs in den vorherigen Untersuchungen ist davon auszugehen, dass zwischen mGBP7 und mGBP6 eine Kolokalisation an der PVM des Parasiten bestand. Die Kolokalisation im Zytosol in *T. gondii* infizierten Zellen war innerhalb dieser Forschungsarbeit vergleichsweise gering. Die nachfolgende STED-Aufnahme in Kooperation mit dem CAI Center an der HHU Düsseldorf, zeigte eine Kolokalisation der mGBP6/mGBP7 Fusionsproteine an der *T. gondii*-PVM. Wiederum wurden signalverstärkende Nano-Booster für GFP und mCherry verwendet (siehe 2.1.3) und auf eine anti-SAG1-Antikörperfärbung verzichtet. *T. gondii* wurde in der Abbildung mit einem Stern kenntlich gemacht.

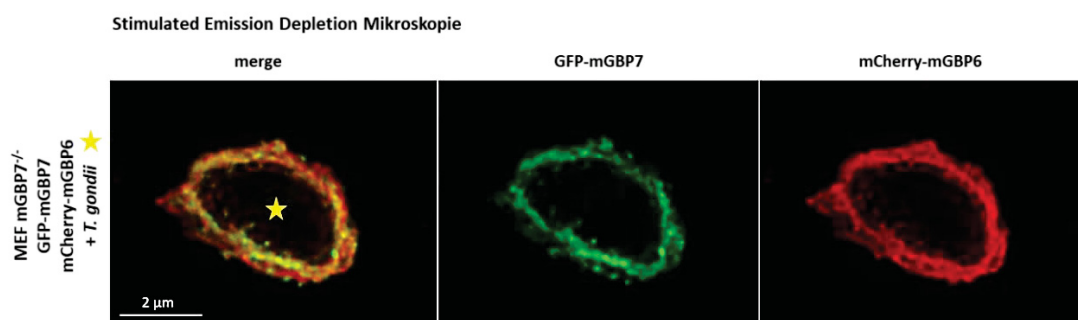


Abbildung 25: STED-Aufnahmen eines *T. gondii*-Parasiten (Stern) in mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCherry-mGBP6 MEF-Zellen. Die Zellen wurden 16 Stunden vor der *T. gondii*-Infektion mit IFN γ stimuliert und 2 h nach der Infektion fixiert. Der Marker entspricht 2 μ m.

In den nachfolgenden Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass mCherry-mGBP6 unabhängig von GFP-mGBP7 an die *T. gondii* PVM akkumulieren konnte und entsprechend nicht durch GFP-mGBP7 beeinflusst wurde. Dafür wurden mGBP7^{-/-} MEF-Zelllinien lentiviral mit mCherry-mGBP6 transduziert,

für 16 h mit IFN γ simuliert, anschließend für 2 h mit *T. gondii* infiziert und mittels Airyscan Mikroskopie analysiert (siehe Abbildung 26).

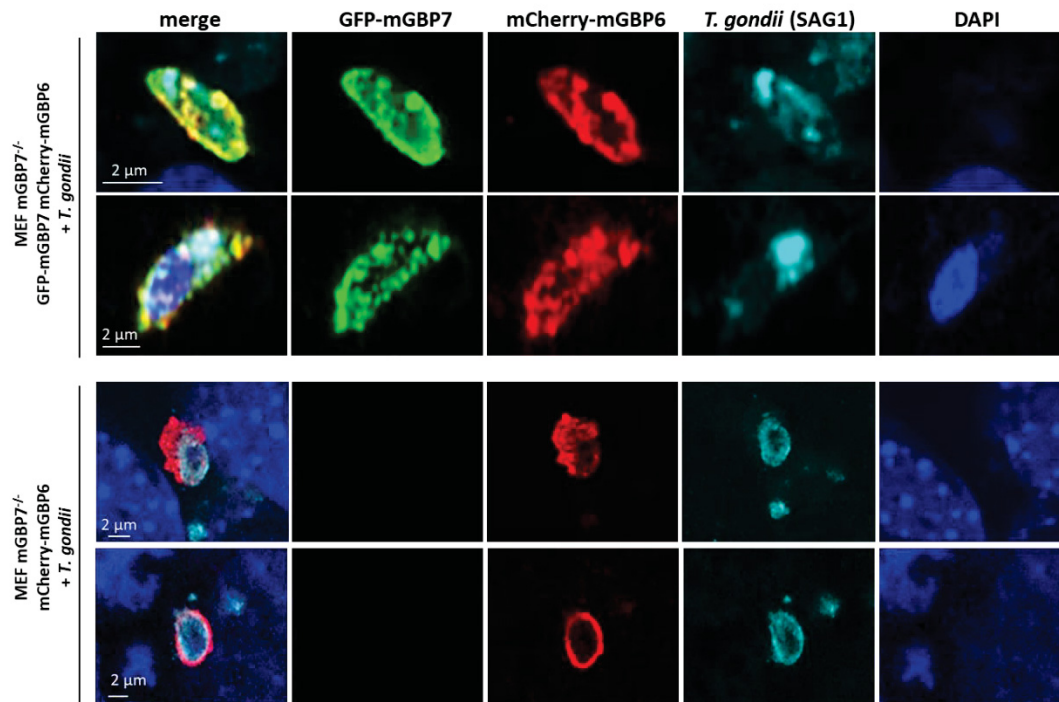


Abbildung 26: Airyscan Aufnahmen der doppelt transduzierten mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 mCh-mGBP6 MEF-Zelllinie und von mGBP7^{-/-} mCh-mGBP6 MEFs. Diese Aufnahmen zeigen die mGBP7-unabhängige *T. gondii*-Akkumulation der mGBP6-Fusionsproteine. Für die *T. gondii*-Färbung wurde eine anti-SAG1-Antikörperfärbung mit dem sekundären AlexaFluor633-gekoppelten Antikörper durchgeführt (Cyan) und DAPI (Blau) verwendet. Die Zellen wurden 16 Stunden vor der Infektion mit IFN γ stimuliert. Der Marker entspricht 2 μ m.

4.2. Interaktionsanalyse von mGBP2 und mGBP7 mit Membranlipiden

Die dieser Forschungsarbeit vorrausgehenden Ergebnisse verdeutlichten, dass sowohl mGBP2 als auch mGBP7 eine wichtige Rolle während der *T. gondii*-Infektion spielen (Degrandi et al., 2013; Steffens et al., akzeptiert). Dabei übernimmt jedes Protein seine eigene Funktion und Rolle, denn sowohl die mGBP2^{-/-} als auch die mGBP7^{-/-} Mäuse zeigen eine signifikante Suszeptibilität gegenüber *T. gondii*-Infektionen (siehe 1.3.1). Des Weiteren zeigen die vorherigen Experimente die unterschiedliche Protein-Lokalisation mit nicht redundanten Funktionen. Anhand der mikroskopischen Auswertungen während einer *T. gondii*-Infektion war eine Akkumulation von mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteinen an der PVM sowie an der *T. gondii*-Plasmamembran zu erkennen. Die vorherigen Ergebnisse und der aktuelle wissenschaftliche Forschungsstand (Kravets et al., 2012; Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016) deuten darauf hin, dass diese Akkumulation letztendlich zur Inaktivierung und zum Abbau des Parasiten führt. Dadurch entstand in dieser Forschungsarbeit die Frage, ob eine direkte Interaktion zwischen mGBPs und den Membranlipiden der PVM und der Plasmamembran des Parasiten besteht oder ob für eine Membran-Akkumulation noch unbekannte Interaktionsmoleküle notwendig sind. Darüber hinaus ist die Lipidzusammensetzung der Parasiten-Membranen bisher unklar. In den nachfolgenden

Experimenten wurden die mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine auf ihre Lipidbindungsfähigkeit untersucht und analysiert.

Versuchsaufbau: Interaktionsanalyse von mGBP2 und mGBP7 mit Membranlipiden

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden N-terminal GFP-gekoppelte mGBP2- und mGBP7-Proteine aus den MEF Zelllinien mGBP2^{-/-} GFP-mGBP2, sowie mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7, isoliert. Dafür wurde die GFP-TRAP Technik von Chromotek angewendet (siehe 3.2.6). Mit Hilfe dieser anti-GFP V_HH-Nanobody-gekoppelten Agarosebeads war eine direkte Immunopräzipitation der Proteine aus dem Zelllysate möglich. Die isolierten Proteine wurden durch Western Blot Analysen und Coomassie Brilliant Blue Stainings auf ihre Masse und Reinheit überprüft. Entsprechend wurden ein anti-GFP-Antikörper und ein sekundärer Ziege-anti-Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt, verwendet (siehe 2.1.2). Ein Malachitgrün GTPase Aktivitätsassay (siehe 3.2.7, Kravets et al., 2012; Legewie et al., 2019) wurde durchgeführt, um die enzymatische Aktivität der Proteine zu messen und somit die korrekte Faltung und Funktionalität der Proteine nach der sauren Aufreinigung zu überprüfen. Die aufgereinigten, isolierten und aktiven GFP-Fusionsproteine wurden darauffolgend für *Membrane Lipid Strips* genutzt, welche mit 15 standardisierten Membranlipiden zu je 100 pmol beladen sind (siehe 3.2.8) und für die Detektion potenzieller Interaktionen der mGBPs mit PVM- und Plasmamembranlipiden verwendet wurden. Die isolierten und aufgereinigten Proteine wurden mit diesen *Lipid Strips* inkubiert und anschließend mittels eines Maus-anti-GFP-Antikörpers und einem sekundären Ziege-anti-Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt, detektiert. Durch die Quantifizierung der Ergebnisse aller Replikate pro Protein (n=5) mittels Fiji/ImageJ, konnte eine potenzielle Lipidaffinität ermittelt werden, da im Allgemeinen diese *Membrane Lipid Strips* lediglich Hinweise auf theoretisch interagierende Lipide geben. Die Ergebnisse ermöglichen somit keine genaue Messung der Bindungsaffinität und sollten nicht als endgültig angesehen werden. Anhand dieser Daten wurden allerdings nachfolgend künstliche Membranen, *Giant Unilamellar Vesicles*, via GUV-Technologie hergestellt (siehe 3.2.9). Durch diese Technologie ist es möglich, eine direkte Protein-Lipid-Interaktion zu analysieren (Madl et al., 2016). Die aufgereinigten, isolierten und GFP-gekoppelten Fusionsproteine wurden zusammen mit den entsprechenden GUVs inkubiert und konfokal-mikroskopisch analysiert. Die Auswertung der direkten Protein-Lipid-Interaktion erfolgte sowohl quantitativ als auch qualitativ. Für die Analyse Protein-spezifischer Akkumulationsmuster an PA- und CL-GUVs wurde nachfolgend anhand von jeweils drei Beispielen die Fusionsprotein-Fluoreszenz entlang der GUV-Oberfläche gemessen und grafisch dargestellt. Zudem wurde die gemeinsame Rekrutierung und Akkumulation der Fusionsproteine mGBP2 und mGBP7 an Membranlipiden untersucht.

Ergebnisse: Interaktionsanalyse von mGBP2 und mGBP7 mit Membranlipiden

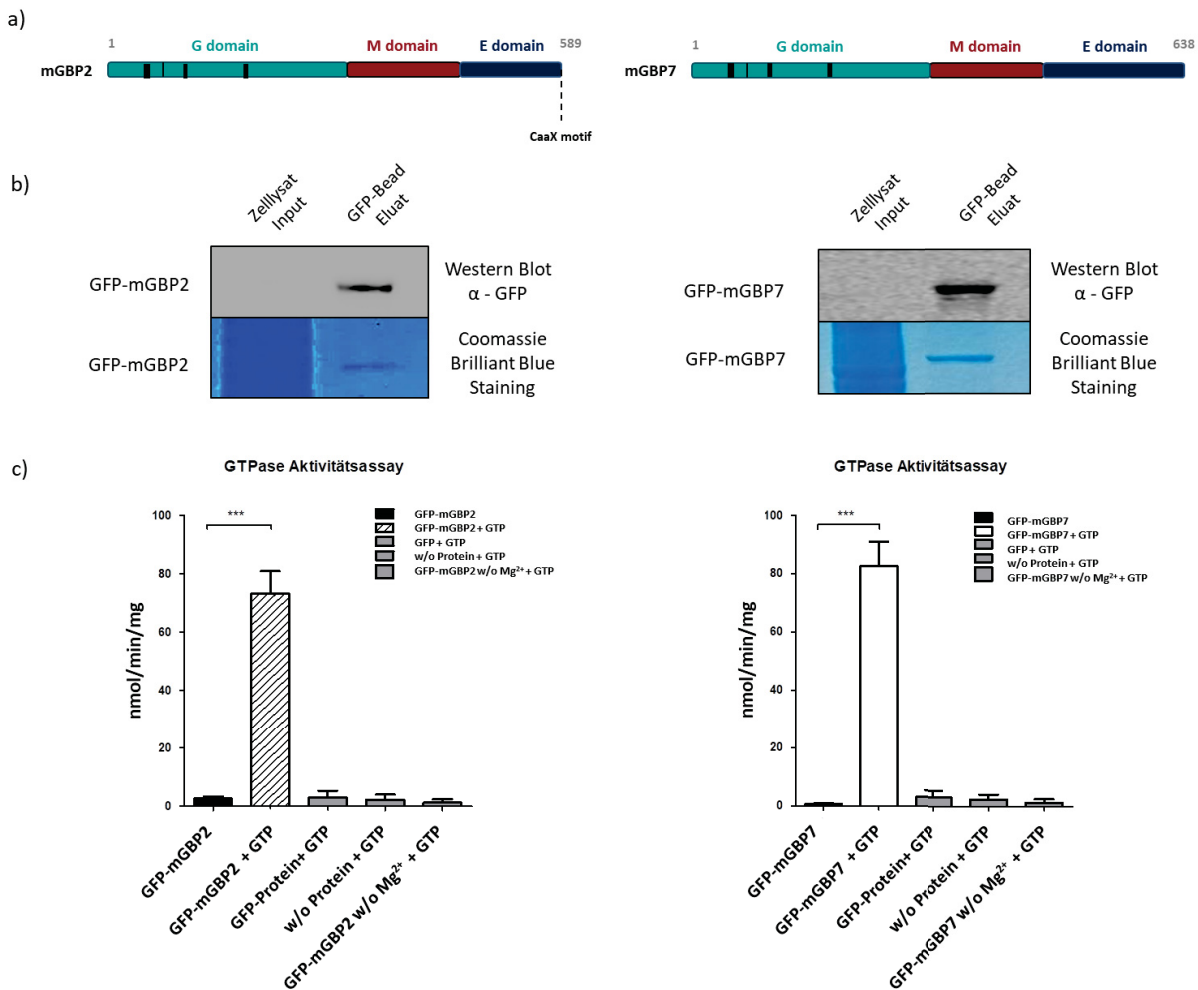


Abbildung 27: Isolation und Aufreinigung GFP-fusionierter, aktiver mGBP2- und mGBP7-Proteine. a) Schema der mGBP-Proteine. Beide Fusionsproteine beinhalten drei charakteristische Domänen (*G domain*, *M domain*, *E domain*). mGBP2 besteht aus 589 Aminosäuren und besitzt ein Isoprenylierungsmotiv (CaaX). mGBP7 besteht aus 638 Aminosäuren. Die schwarzen Boxen entsprechen den konservierten Nukleotid-Bindemotiven (G1 – G4). b) Die GFP-gekoppelten Proteine wurden mittels GFP-TRAP aus dem Zelllysat isoliert, nach Western Blotting durch einen anti-GFP-Antikörper sowie sekundären Ziege-anti-Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt, bei circa 100 kDa nachgewiesen und im Coomassie Brilliant Blue Staining auf die Reinheit überprüft. c) Der Malachitgrün GTPase Aktivitätsassay untersucht die GTP-Hydrolysefähigkeit der Proteine. Die GFP-gekoppelten Proteine zeigten bei einer GTP-Zugabe eine hohe Aktivität. Als Kontrollen wurden das Protein ohne GTP-Zugabe, das nicht-fusionierte GFP-Protein, Proben ohne Proteinzusatz und Proben ohne Magnesiumzusatz (Kofaktor für die GTP-Bindung) getestet.

Die Ergebnisse (Abbildung 27) zeigten, dass gereinigte mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine für die Detektion von Interaktionen mit potenziellen PVM- und Plasmamembranlipide des *T. gondii*-Parasiten verwendet werden konnten. In einem ersten Experiment wurden hierzu *Membrane Lipid Strips* verwendet.

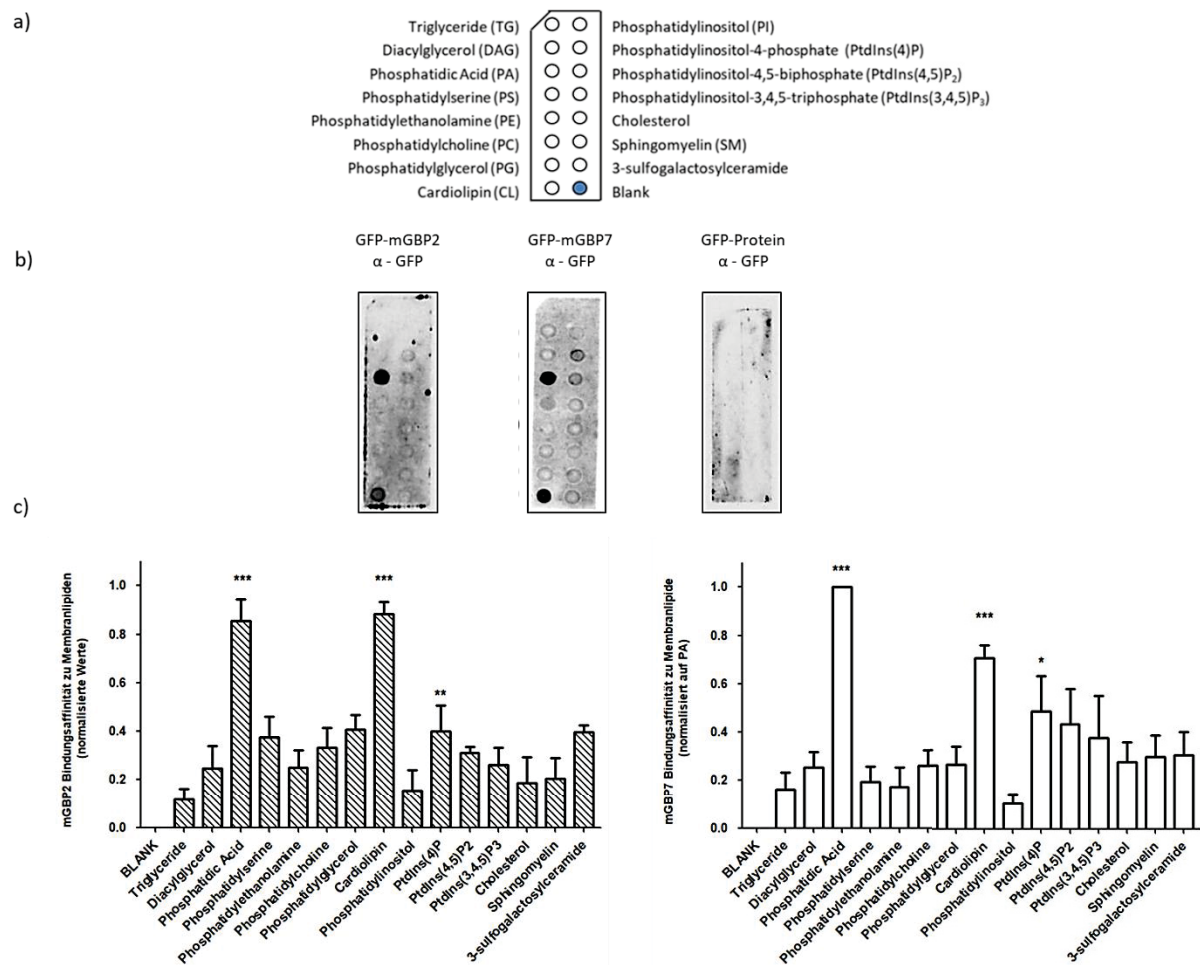


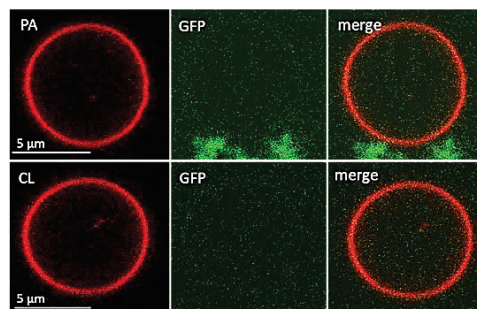
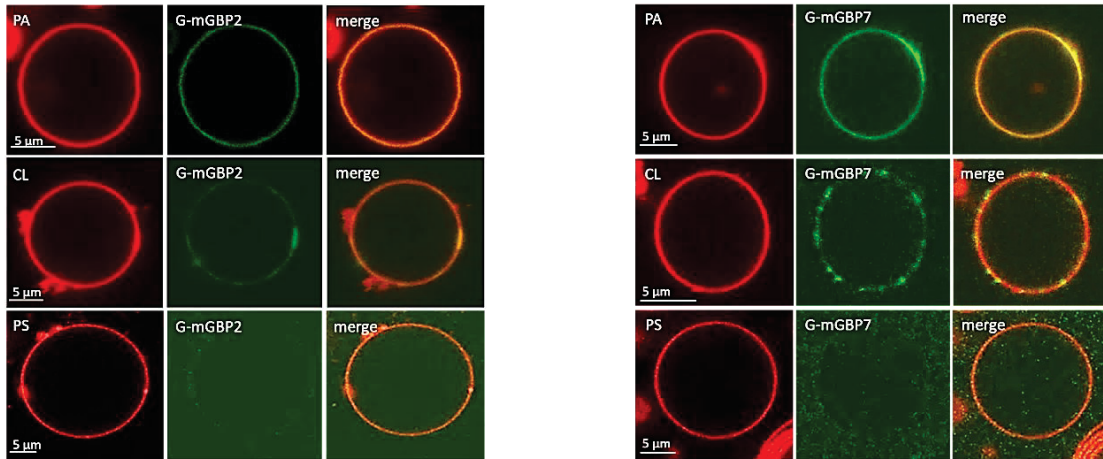
Abbildung 28: Auswertung der Membranlipidinteraktionen von GFP-gekoppelten mGBP2- und mGBP7-Proteinen. a) Schema eines *Membrane Lipid Strips* mit der Beladung von 15 Membranlipiden und einer Kontrolle (Blank). b) Repräsentative *Membrane Lipid Strips* nach der Interaktion mit den Fusionsproteinen mGBP2 und mGBP7 sowie mit dem nicht-fusionierten GFP als Kontrollprotein. Alle Proteine wurden mit einem Maus-anti-GFP-Antikörper und einem sekundären Ziege-anti-Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt, detektiert. c) Die Lipidinteraktionen pro Protein (5 Replikate) wurden mittels ImageJ/Fiji quantifiziert und grafisch dargestellt. Dabei waren sowohl für GFP-mGBP2 als auch für GFP-mGBP7 die höchsten Affinitäten bei Phosphatidsäure (*phosphatidic acid*, PA) und Cardiolipin (CL) zu beobachten. Diese Affinitäten wurden zu der Leerprobe (Blank) berechnet und waren hoch signifikant. Phosphatidylinositol-4-phosphat (PtdIns(4)P) zeigte ebenfalls eine signifikante Affinität für beide Proteine. Die weiteren Membranlipide wurden für die fortlaufende Forschungsarbeit aufgrund geringer Affinitätswerte und nicht-signifikanter Ergebnisse nicht weiter verfolgt.

Die Quantifizierung der *Membrane Lipid Strips* verdeutlichte besonders hohe und signifikante Affinitäten für Phosphatidsäure (PA) und Cardiolipin (CL). Trotz der ermittelten Signifikanz für PtdIns(4)P, wurde für die weiteren Experimente der Fokus auf PA und CL gelegt. Für Phosphatidylserin (PS) konnte keine Bindung an den Fusionsproteinen mGBP2 oder mGBP7 nachgewiesen werden, obwohl PA und PS sich strukturell sehr ähnlich sind. Aus diesem Grund wurde PS für die weiteren Untersuchungen als Kontrolllipid verwendet (für genauere Informationen über PA, CL und PS, siehe Diskussion, Abschnitt 5.2, Abbildung 42 – 44).

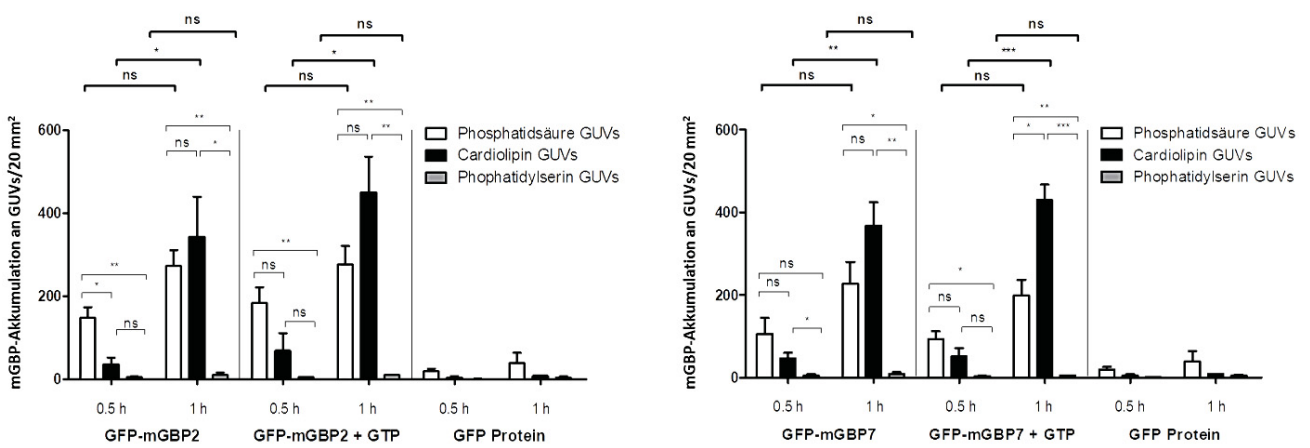
Die *GUV*-Technologie (*Giant Unilamellar Vesicles*) bietet die Möglichkeit, eine künstliche Membran aus ausgewählten, in Chloroform-gelösten Lipiden *via* Elektroformation aufzubauen. Anhand dieser Methode kann eine direkte Protein-Lipid-Interaktion analysiert werden (Madl et al., 2016). Die *GUVs*

wurden entsprechend der vorausgehenden Ergebnisse mit PA, CL und PS hergestellt (siehe 3.2.9). Zusätzlich wurden die Membranen mit TexasRed für die Detektion im Konfokalmikroskop gefärbt. Die aufgereinigten, isolierten und GFP-gekoppelten Proteine wurden zusammen mit den entsprechenden GUVs inkubiert, konfokal-mikroskopisch analysiert und sowohl quantitativ als auch qualitativ ausgewertet.

a)



b)



c)

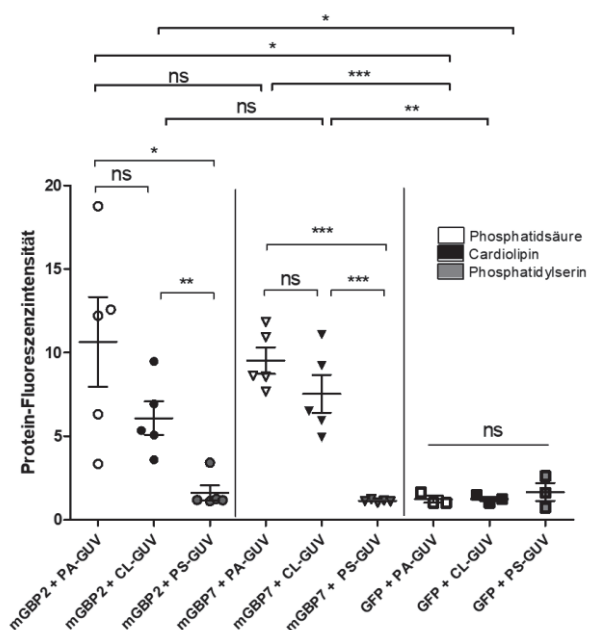


Abbildung 29: Direkte Protein-Lipid-Interaktion der Fusionsproteine mGBP2 und mGBP7 mit Phosphatidsäure und Cardiolipin. a) Konfokal-mikroskopische Auswertung: GFP-gekoppelte mGBP2- und mGBP7-Proteine interagierten mit TexasRed-gefärbte PA- und CL-GUVs, aber nicht mit PS-GUVs. Als Kontrolle wurde nicht-fusioniertes GFP-Protein mit PA- und CL-GUVs gezeigt. Es war keine Interaktion nachweisbar. Der Marker entspricht 5 μm . b) Quantitative Auswertung der mGBP-positiven GUVs: Zählung aller mGBP-positiven GUVs auf einer Fläche von 20 mm^2 nach 0.5 Stunden (h) und 1 Stunde (h). Dies wurde auch in Anwesenheit von GTP geprüft, allerdings zeigte sich kein Einfluss von GTP auf die GUV-Akkumulation. Es konnte ein Anstieg der Lipid-Akkumulation innerhalb einer Stunde insbesondere für Cardiolipin aber auch für Phosphatidsäure nachgewiesen werden. c) Qualitative Auswertung der Protein-Fluoreszenzintensität an GUVs: Gezeigt werden die Werte von je 5 unterschiedlichen GUV-Aufnahmen.

Die Analyse der direkten Protein-Lipid-Interaktion der Fusionsproteine mGBP2 und mGBP7 mit Phosphatidsäure und Cardiolipin in Abbildung 29 ergab, dass sowohl mikroskopisch (29a), quantitativ (29b) als auch qualitativ (29c) eine spezifische Fluoreszenzintensität der GFP-gekoppelten Proteine an den TexasRed-markierten GUVs nachgewiesen werden konnte. Dabei wurde deutlich, dass die Fluoreszenzintensität der Fusionsproteine für PA und CL sich signifikant von der PS-Intensität unterschied, wodurch eine deutliche Protein-Interaktion zu PA und CL erkennbar war, jedoch nicht für PS, trotz dessen strukturellen Ähnlichkeit zur Phosphatidsäure. Auch die GFP-Kontrollen zeigten keine Lipid-Interaktion. Des Weiteren konnte die Unabhängigkeit der Proteine von GTP bezüglich der Lipid-Akkumulation nachgewiesen werden (29b). Nachfolgend wurde an jeweils drei repräsentativen GUVs die Proteinfluoreszenz entlang der GUV-Oberfläche gemessen und grafisch dargestellt, um das Akkumulationsmuster der mGBPs zu analysieren.

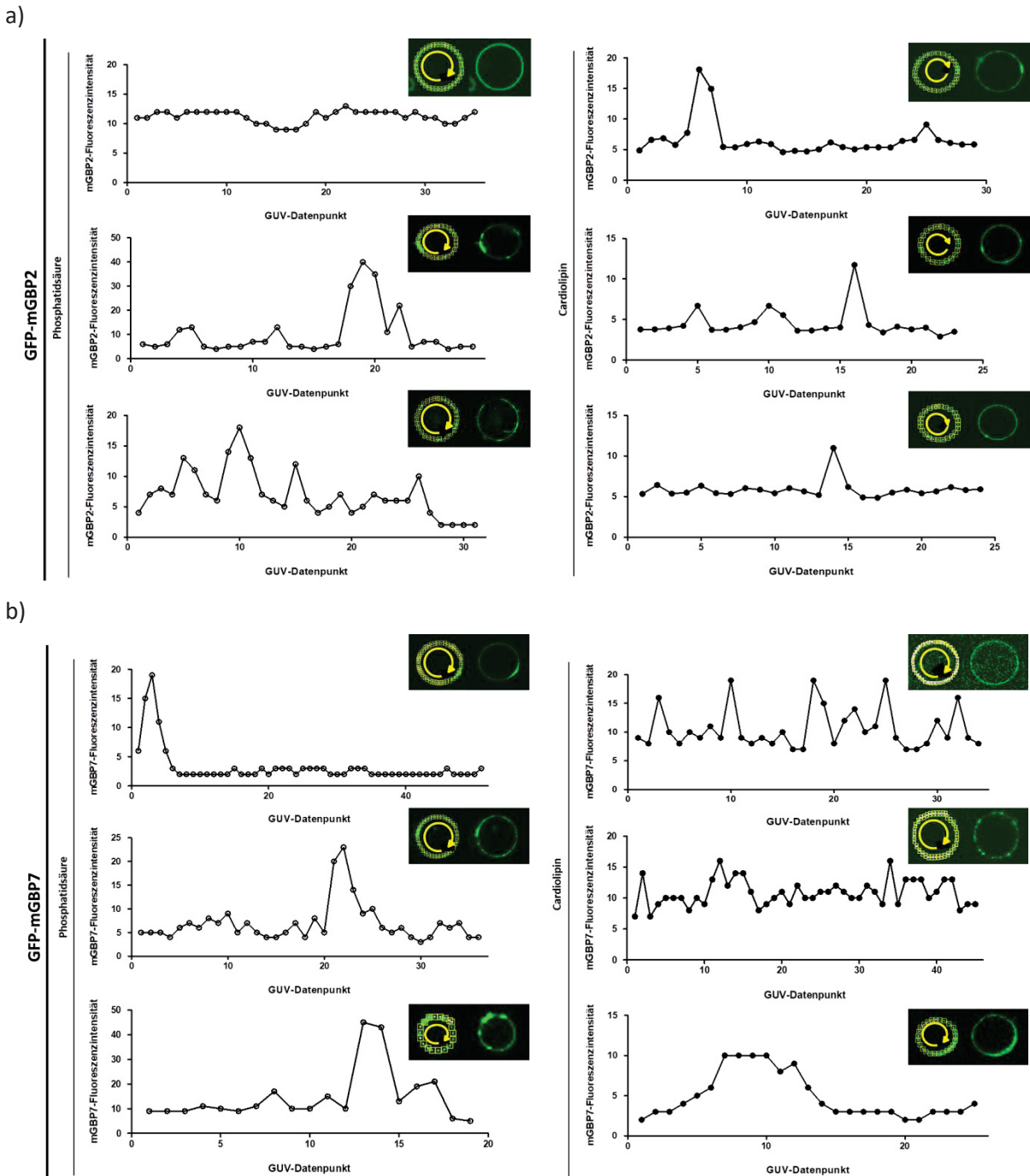


Abbildung 30: Analyse der Protein-spezifischen Akkumulation der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine an Phosphatidsäure- und Cardiolipin-GUVs. a) GFP-mGBP2 an PA- bzw. CL-GUVs: In den Akkumulationsmustern gab es kaum Unterschiede. Mit Ausnahme einer gleichmäßig verteilten Protein-Akkumulation an dem oberen PA-GUV und einer ungleichmäßig verteilten Akkumulation an dem unteren PA-GUV, zeigten die weiteren Akkumulationsmuster ein bis zwei Peaks mit erhöhter mGBP2-Akkumulation. b) GFP-mGBP7 an PA- bzw. CL-GUVs: Es war ein Unterschied zwischen der Akkumulation an PA und CL sichtbar. Die PA-Akkumulation zeigte jeweils einen deutlichen Fluoreszenz-Peak mit erhöhter mGBP7-Akkumulation, bei den CL-GUVs war eine unregelmäßige Verteilung entlang der gesamten GUV-Oberfläche detektierbar. Mit Ausnahme der unteren CL-GUV-Auswertung, dessen Akkumulationsmuster nicht den vorherigen entsprach.

Die Auswertung der Akkumulationsmuster aus Abbildung 30 verdeutlicht, dass die mGBP2-Akkumulation zwischen den untersuchten Lipiden ähnlich war, mit jeweils einem Peak

erhöhter mGBP2-Fluoreszenz insbesondere bei der Cardiolipin-Interaktion. Die mGBP7-Akkumulation unterschied sich zwischen den Lipiden. Während die PA-Akkumulation jener von mGBP2 ähnelte, ergab die CL-Akkumulation eine unregelmäßige Verteilung entlang der gesamten GUV-Oberfläche. Eventuell sind die Akkumulationsmuster der mGBPs bezüglich der Lipide spezifisch, wofür weitere Experimente notwendig sind, um dies eindeutig zu belegen.

In vorherigen Ergebnissen dieser Forschungsarbeit (siehe Abbildung 13 – 15) konnte festgestellt werden, dass *in vitro* mGBP2 die Rekrutierung und Akkumulation von mGBP7 an *T. gondii* beeinflusst. Entsprechend sollte dieses Phänomen anhand der direkten Protein-Lipid-Interaktion durch GUVs ebenfalls untersucht werden. Daraus resultierend wurden neben den GFP-gekoppelten Proteinen auch mCherry-gekoppelte Proteine *via* RFP-TRAP (siehe 3.2.6) aus den Zelllysaten der entsprechenden Zelllinien isoliert, aufgereinigt und auf ihre GTP-Hydrolyseaktivität getestet. Die Kombination an Proteinen (GFP-mGBP2 + mCH-mGBP7, GFP-mGBP7 + mCH-mGBP2) wurde mit ungefärbten GUVs inkubiert und konfokal-mikroskopisch analysiert.

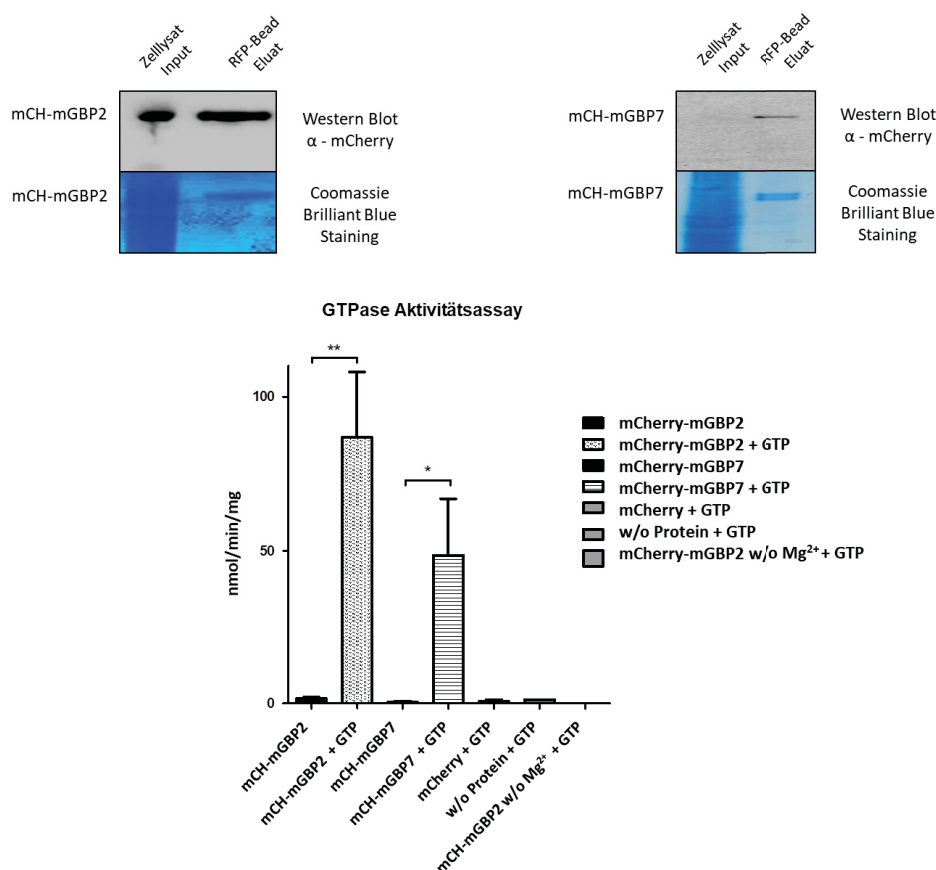
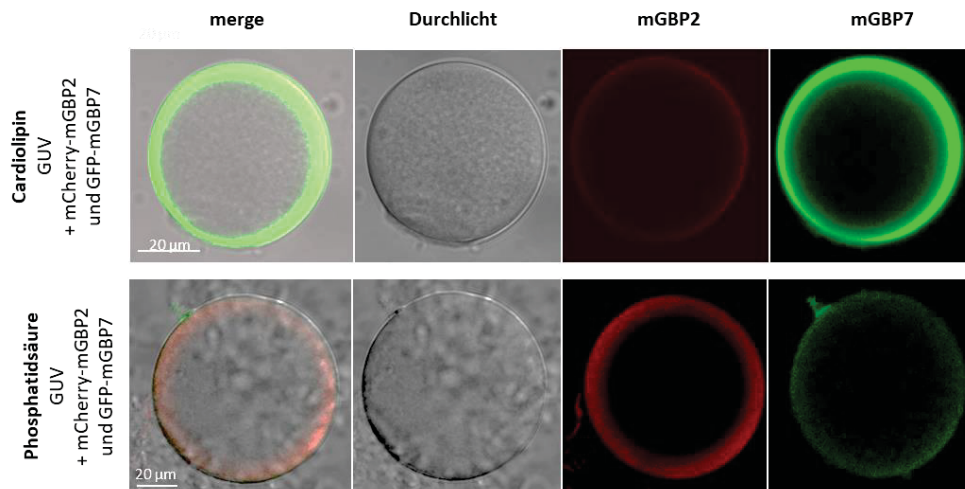


Abbildung 31: Nachweis der isolierten, aufgereinigten und aktiven mCherry-gekoppelten mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine. Diese wurden per Western Blot mit einem anti-mCherry-Antikörper (siehe 2.1.2) und einem sekundären Ziege-anti-Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt, bei circa 100 kDa detektiert, durch ein Coomassie Brilliant Blue Staining auf Reinheit überprüft und mittels Malachitgrün GTPase Assays auf die Hydrolyseaktivität untersucht. Beide mCherry-gekoppelten Proteine zeigten bei der Zugabe von GTP eine GTPase Aktivität.

Die Ergebnisse aus Abbildung 31 zeigen die erfolgreiche Isolation und Aufreinigung der aktiven, mCherry-gekoppelten mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine. Bedingt durch die vorherigen Ergebnisse der Rekrutierung von mGBP2- und mGBP7-Proteinen an der *T. gondii*-PVM *in vitro* (4.1.1, Abbildung

15), wurden ungefärbte PA- und CL-GUVs nach mGBP2-positiven-, mGBP7-positiven- oder mGBP2 + mGBP7-positiven GUVs ausgewertet.

a)



b)

c)

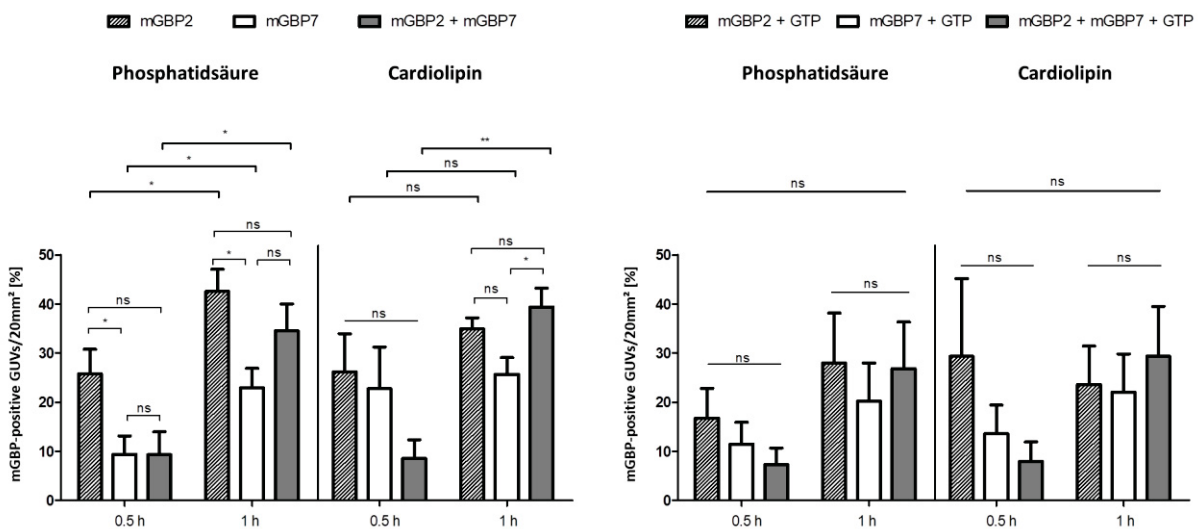


Abbildung 32: Interaktionsanalyse der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine in Bezug auf Lipidbindungen. a) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von ungefärbten PA- und CL-GUVs, inkubiert mit einer Kombination aus mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteinen. Die mikroskopischen Aufnahmen ergaben, dass beide Proteine gemeinsam an die GUVs akkumulieren konnten. Die Akkumulationsmenge der einzelnen mGBPs variierte. Der Marker entsprach 20 μm . b) und c) Quantitative Auswertung der GUV-Akkumulation beider Fusionsproteine in Ab- und Anwesenheit von GTP. Die Gesamtzahl aller gezählten GUVs pro Ansatz wurde auf 100 % gesetzt.

Die Ergebnisse aus Abbildung 32 zeigen, dass die beide Fusionsproteine kombiniert an GUV-Membranen akkumulieren konnten. Diese Akkumulation geschah unabhängig von GTP. Die quantitative Auswertung ohne GTP-Zusatz (32b) veranschaulichte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen mGBP-Fusionsproteinen für die PA-Interaktion nach 0,5 Stunden, aber nicht im Vergleich zu der mGBP-Kombination beider Proteine. Es war ein signifikanter Anstieg mGBP-positiver PA-GUVs zwischen 0,5 h und 1 h detektierbar. Für die CL-Akkumulation wurden zwischen 0,5 h und 1 h keine signifikanten Unterschiede detektiert. Nach einer Stunde war die Anzahl der doppelt-assoziierten GUVs signifikant erhöht zu den mGBP7-positiven GUVs. Die Zugabe von GTP

(32c) hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Protein-Lipid-Interaktion. Diese Auswertung zeigte im Vergleich zu den *in vitro* Daten keine vergleichbaren Werte, sodass innerhalb des isolierten GUV-Systems keine generelle gegenseitige Beeinflussung der Fusionsproteine bezüglich der Lipid-Interaktion ermittelt werden konnte.

Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass sowohl mGBP2 als auch mGBP7 eine direkte Protein-Lipid-Interaktion mit Phosphatidsäure und Cardiolipin eingehen können. Diese Interaktion ist unabhängig von einer GTP-Zugabe und folglich von der GTPase Aktivität. In Bezug auf die GUV-Akkumulation bestand keine Rekrutierungs-Hierarchie oder eine untereinander auftretende Beeinflussung der Fusionsproteine.

4.3. Untersuchung der mGBP7-Bindungsstelle für die Lipid-Interaktion

Die Proteine mGBP2 und mGBP7 unterscheiden sich nicht nur durch die Anzahl ihrer Aminosäuren (589 und 638), sondern vor allem durch das zusätzliche Isoprenylierungsmotiv von mGBP2. Dieses Isoprenylierungsmotiv (CaaX) spielt eine wichtige Rolle bei der Membraninteraktion. Wie bereits bewiesen, können mGBP2-Trunkationsmutanten ohne Isoprenylierungsmotiv nicht mehr an *T. gondii* akkumulieren (Degrandi et al., 2013). Das mGBP7-Protein besitzt kein Isoprenylierungsmotiv (Degrandi et al., 2007). Dennoch konnte eine deutliche, direkte Interaktion von mGBP7 mit Membranlipiden der *T. gondii*-PV und Plasmamembran in dieser Arbeit gezeigt werden. Es stellte sich daher die Frage, mit welcher strukturellen Einheit das mGBP7-Protein trotz fehlendem Isoprenylierungsmotiv mit Lipiden (PA, CL) interagieren kann. Diese Frage konnte in dieser Forschungsarbeit beantwortet werden und wird nachfolgend dargestellt.

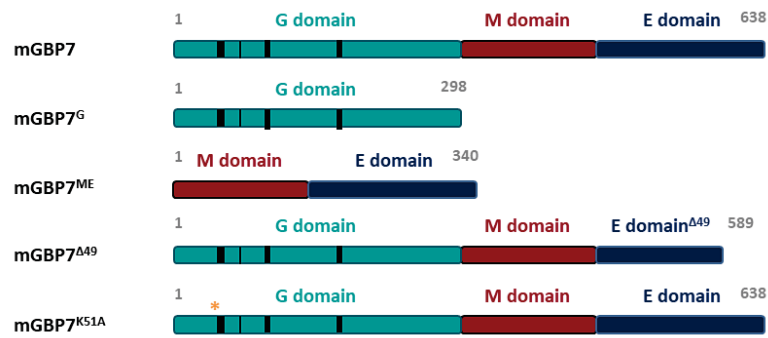
Versuchsaufbau: Die Untersuchung der mGBP7-Bindestelle für Lipid-Interaktionen

Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden verschiedene mGBP7-Trunkationsmutanten hergestellt (siehe 2.4.1.1). Diese Mutanten umfassten entweder eine Kombination unterschiedlicher mGBP-Domänen, eine Deletion von den C-terminalen 49 Aminosäuren (aufgrund bioinformatischer Analysen, die diese als essentiell für Membraninteraktionen detektierten, siehe Legewie et al., 2019) oder eine K51A-Punktmutation (das Lysin (K) an der 51. Position wurde zu einem Alanin (A) mutiert), was einen vollständigen Verlust der GTP-Hydrolyse herbeiführt (Legewie et al., 2019). GFP wurde N-terminal an die neu klonierten mGBP7-Mutanten gekoppelt. Die Mutanten wurden lentiviral in mGBP7-defiziente MEF-Zelllinien transduziert. Die Isolation und Aufreinigung der GFP-gekoppelten Proteine fand durch GFP-TRAP statt. In den nachfolgenden Experimenten wurden die Akkumulation der Trunkationsmutanten an *T. gondii*-PVs und an Lipide mittels konfokal-mikroskopischer Analysen, *Membrane Lipid Strips* und durch die GUV-Technologie untersucht und grafisch dargestellt.

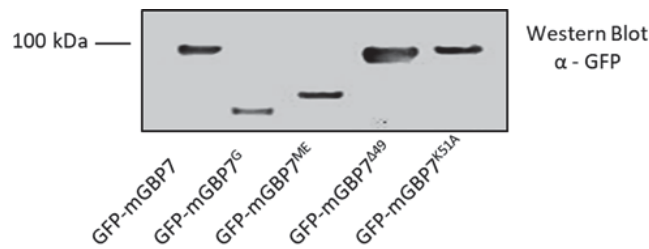
Ergebnisse: Die Identifikation der mGBP7-Bindestelle für Lipid-Interaktionen

Die GFP-gekoppelten trunkierten Fusionsproteine wurden mittels Western Blot nachgewiesen. Der Malachitgrün GTPase Aktivitätsassay wurde zur Untersuchung der GTP-Hydrolyse durchgeführt, um die funktionellen Eigenschaften der unterschiedlichen Trunkationsmutanten zu analysieren.

a)



b)



c)

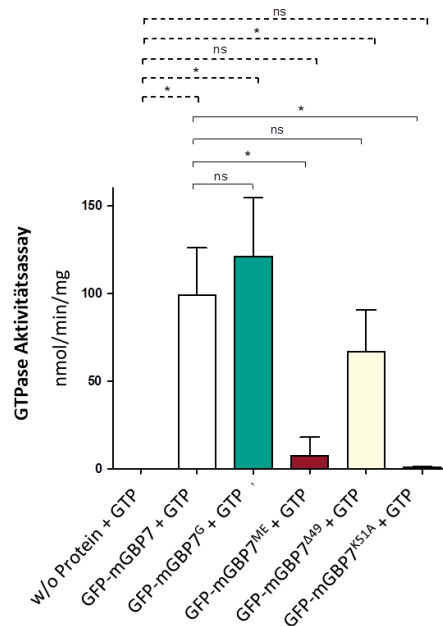
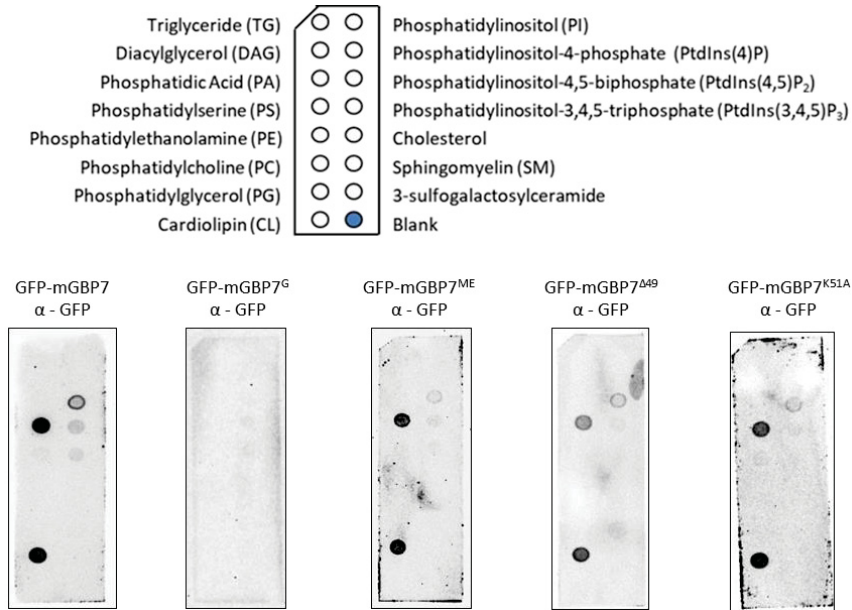


Abbildung 33: Die Isolation und Aufreinigung der aktiven GFP-mGBP7-Mutantenproteine. a) Schema der hergestellten mGBP7-Trunktionsmutanten. mGBP7^G bestand nur aus der *G domain* des mGBP7-Proteins, mGBP7^{ME} aus der *Middle-* und *E domain*, mGBP7^{Δ49} wies eine Deletion der C-terminalen 49 Aminosäuren auf und mGBP7^{K51A} beinhaltete eine Punktmutation in der G1 Region (Stern), welche zu einem vollständigen Verlust der GTP-Hydrolysefähigkeit führte. b) Western Blot der GFP-gekoppelten, isolierten Mutationsproteine. Für die Detektion wurde ein anti-GFP-Antikörper und ein sekundärer Ziege-anti-Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt, verwendet. c) Malachitgrün GTPase Aktivitätsassay der Trunktionsmutanten im Vergleich zu GFP-mGBP7 (Weiß). mGBP7^G (Grün) und mGBP7^{Δ49} (Gelb) zeigten eine GTP-Hydrolyseaktivität, mGBP7^{ME} (Rot) und mGBP7^{K51A} (Blau) zeigten keine GTPase Aktivität.

Die Ergebnisse aus Abbildung 33b) zeigen, dass die GFP-gekoppelten trunktierten und mutierten Proteine exprimiert wurden und die vorausgesetzten molaren Massen aufwiesen. Der

GTPase Aktivitätsassay (33c) zeigte die Funktion der mGBP *G domain* auf die GTP-Hydrolyse. Die alleinige *G domain* der mGBP7^G-Mutante (Grün) hatte eine GTP-Hydrolyse Effizienz vergleichbar zum Wildtyp (WT) mGBP7. Auch die mGBP7^{Δ49}-Mutante (Gelb) mit einer Deletion der C-terminalen 49 Aminosäuren wies eine GTPase Aktivität auf, welche keinen signifikanten Unterschied zu WT mGBP7-Proteinen ergab. Die Mutanten mGBP7^{ME} (Rot) und mGBP7^{K51A} (Blau) zeigten hingegen keine GTPase Aktivität. Dies war auf die fehlende *G domain* innerhalb der Proteinstruktur und die durchgeführte Punktmutation in der G1-Region in der *G domain* zurückzuführen, welche zu dem Verlust der GTP-Hydrolyse führte (siehe Legewie et al., 2019). Die mutierten mGBP7-Proteine wurden für weitere Untersuchungen bezüglich ihrer Lipidinteraktion verwendet.

a)



b)

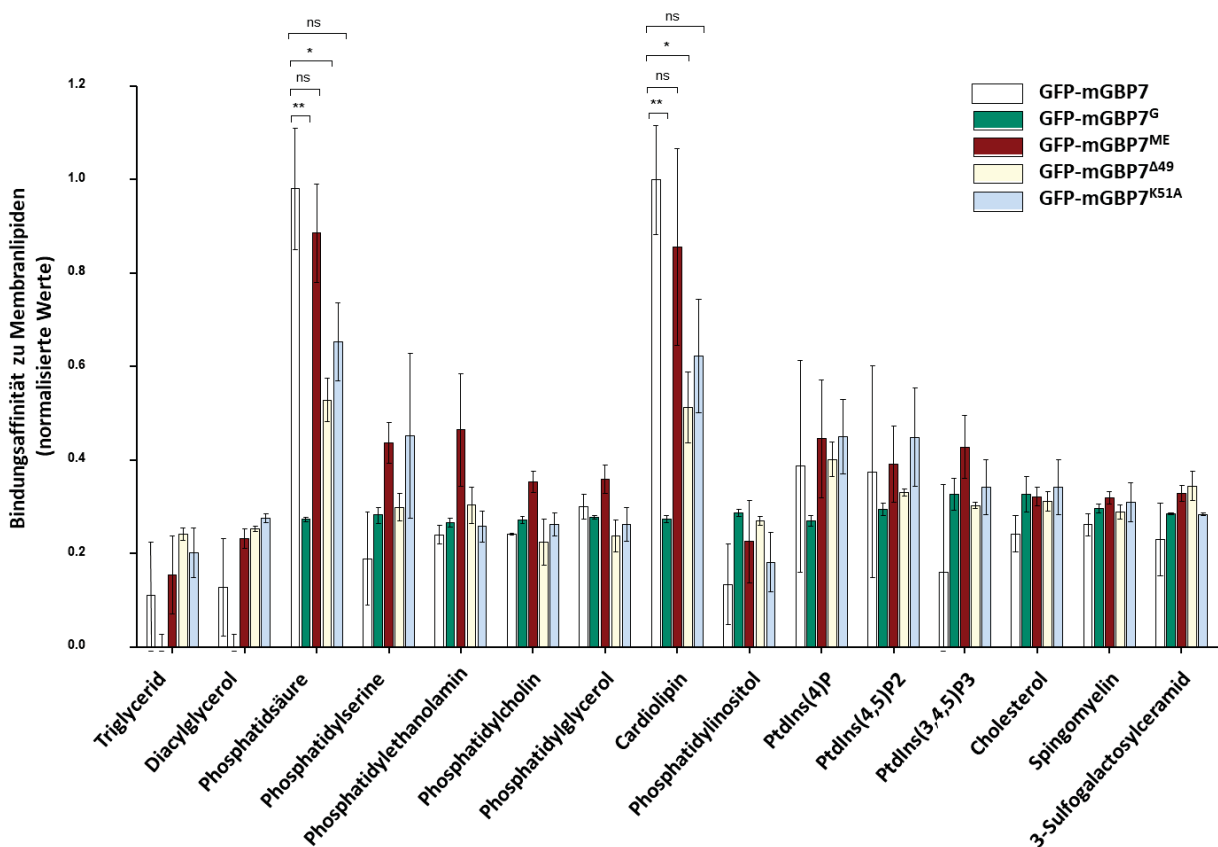


Abbildung 34: Membrane Lipid Strips sowie deren quantitative Auswertung für den Nachweis der Lipid-Interaktionen der mGBP7-Mutanten. a) Beispielhafte Membran Lipid Strips zur Testung einer potenziellen Lipid-Affinität der einzelnen GFP-gekoppelten mGBP7-Mutanten. Die Detektion wurde mit einem anti-GFP-Antikörper und einem sekundären Ziege-anti-Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt, durchgeführt. b) Quantitative Auswertung der Membran Lipid Strips anhand von mindestens drei Replikaten pro Trunktionsmutante. Für die weitere Analyse wurde der Fokus auf Phosphatidsäure und Cardiolipin gelegt. Die übrigen Lipide wurden aufgrund der geringen Bindungsaffinitäten und nicht-signifikanter Werte nicht weiter berücksichtigt.

Die Auswertungen der *Membrane Lipid Strips* in Abbildung 34 in Bezug auf potenzielle Lipid-Affinitäten der einzelnen Mutanten ergab starke Unterschiede zwischen den verschiedenen mGBP7-Varianten. Das GFP-mGBP7^G-Protein zeigte keine signifikanten Lipidbindungen. GFP-mGBP7^{ME} zeigte trotz fehlender GTPase Aktivität ähnliche Lipid-Affinitäten und Bindungseigenschaften wie GFP-mGBP7. Dies galt auch für die GFP-mGBP7^{K51A}-Mutante. Bei der GFP-mGBP7^{Δ49}-Mutante waren optisch schwache Bindungseffekte zu PA, CL und PtdIns(4)P detektierbar. Die quantitative Auswertung der *Lipid Strips* zeigte, dass diese Bindungseffekte signifikant verschieden zu GFP-mGBP7 waren. Nachfolgend wurde eine Analyse der *in vitro* Proteinlokalisierung der Mutanten in *T. gondii* infizierten Zellen durchgeführt, welche zur weiteren Aufklärung der Akkumulationseigenschaften diente. Dazu wurden mGBP7^{-/-} Zellen mit den entsprechenden Konstrukten lentiviral transduziert. Die neu generierten mGBP7-defizienten, mit den mutierten Proteinen rekonstituierten Zelllinien, wurden mit *T. gondii* infiziert und nach 2 h Infektionszeit für die Airyscan Mikroskopie fixiert. Die *T. gondii*-PV wurde mit einer anti-SAG1-Antikörperfärbung und dem sekundären AlexaFluor633-Antikörper visualisiert (siehe 2.1.2). Zudem wurde die Proteinlokalisierung der Mutanten in uninfizierten Zellen untersucht, in denen mGBP7 normalerweise in zytoplasmischen VLS vorliegt (Degrandi et al., 2007; Legewie et al., 2019).

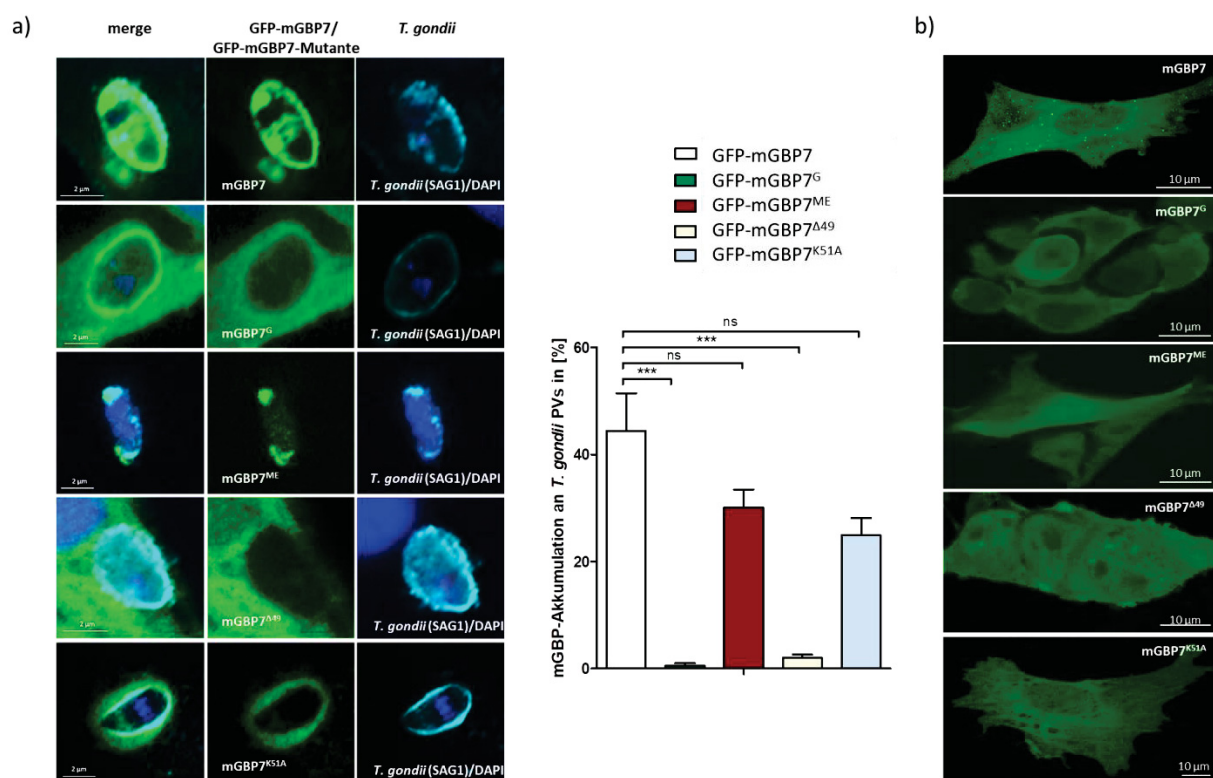


Abbildung 35: *In vitro* Lokalisation der GFP-mGBP7-Mutantenproteine im Vergleich zu GFP-mGBP7. Die Zellen wurden 16 Stunden vor der Fixierung mit IFN γ stimuliert und nach 2 h fixiert. a) Lokalisation der Mutantenproteine im Vergleich zu mGBP7 während einer *T. gondii*-Infektion. Für die *T. gondii*-Färbung wurde eine anti-SAG1-Antikörperfärbung mit dem sekundären Antikörper AlexaFluor633 (Cyan) durchgeführt und DAPI für die DNA-Färbung (Blau) verwendet. Die Mutanten GFP-mGBP7^G und GFP-mGBP7^{Δ49} zeigten keine *T. gondii*-PVM Akkumulation. Der Marker entspricht 2 μ m. Pro Ansatz und Zelllinie wurden jeweils mindestens 100 Parasiten gezählt und quantitativ ausgewertet. c) Mutationszellen im Vergleich zu mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7. Die mGBP7-Proteine formieren sich unter IFN γ -Stimulation ohne *T. gondii*-Infektion in sogenannten VLS. Für die Mutantenproteine war dieser Effekt nicht nachweisbar. Der Marker entspricht 10 μ m.

Die in Abbildung 35 dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die GFP-fusionierten Trunktionsproteine mGBP7^G und mGBP7^{Δ49} während einer *T. gondii*-Infektion nicht an die PVM des Parasiten akkumulieren konnten. Die Fusionsproteine mGBP7^{ME} und mGBP7^{K51A} zeigten weiterhin eine effektive Akkumulation an die *T. gondii*-PVM. Die PVM-Assemblierung der mGBP7^{K51A} Fusionsproteine wirkte vergleichsweise zu der direkten Akkumulation der mGBP7^{ME}-Proteine an die PVM „locker assoziiert“. Die quantitative Auswertung der mGBP-Akkumulation an die *T. gondii*-PVM bestätigt die initialen Ergebnisse. Die Auswertung verdeutlichte die signifikanten Unterschiede zwischen den mGBP7-, mGBP7^{ME}- und mGBP7^{K51A}-Fusionsproteinen zu den mGBP7^G- und mGBP7^{Δ49}-Fusionsproteinen, die einen Verlust der *T. gondii*-Akkumulationsfähigkeit aufwiesen. In den uninfizierten, stimulierten Zellen lokalisierte das GFP-mGBP7-Fusionsprotein in VLS. Diese Lokalisation war in keiner der Zelllinien mit den mGBP7-Mutanten nachweisbar. Nachfolgend wurde die direkte Lipid-Interaktion der mGBP7-Mutanten untersucht. Dafür wurde erneut die GUV-Technologie mit PA- und CL-GUVs verwendet.

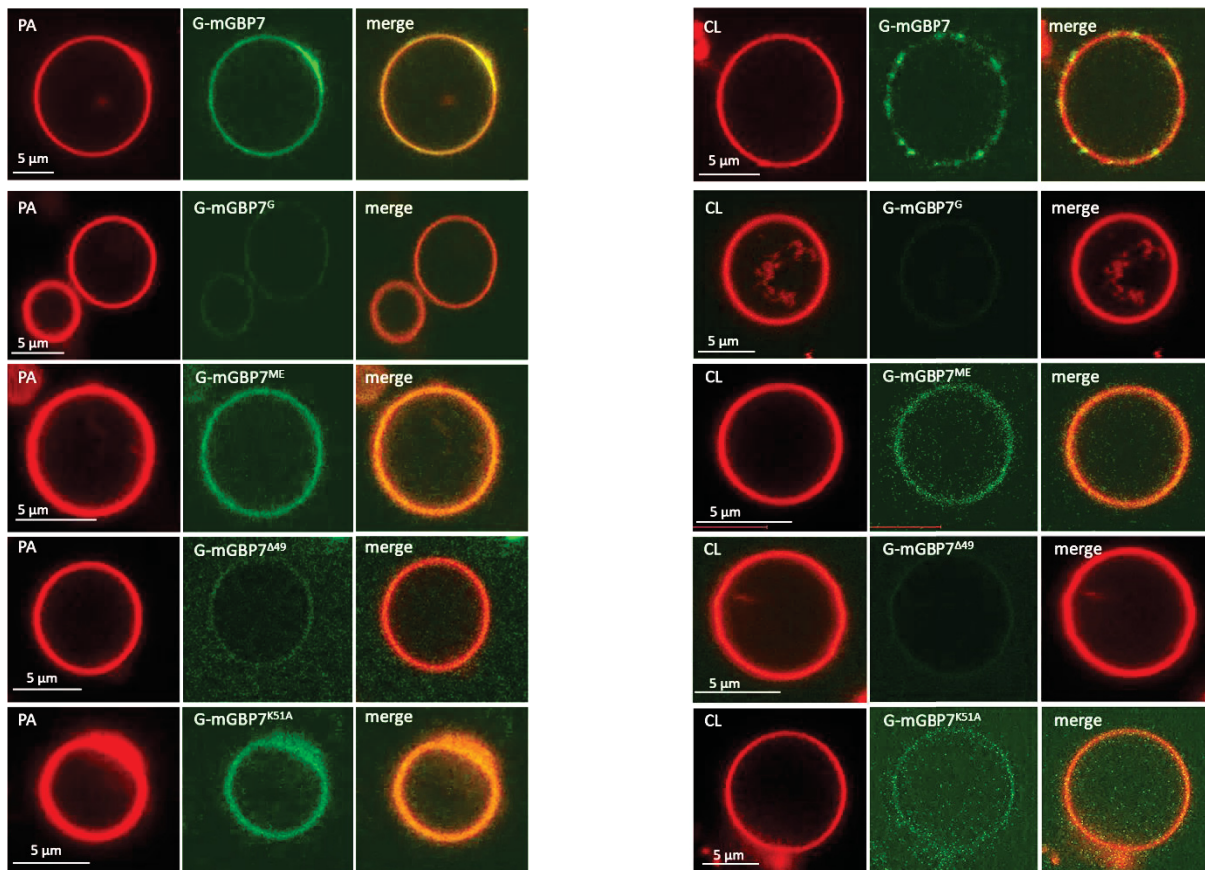


Abbildung 36: Analyse der direkten Lipid-Interaktion der GFP-fusionierten mGBP7-Mutanten an Phosphatidsäure und Cardiolipin im Vergleich zu GFP-mGBP7. Im Allgemeinen war die mGBP7-GUV-Interaktion stärker im Vergleich zu den Mutanten-Interaktionen an die GUVs. Dennoch war eine GFP-mGBP7^{ME} und GFP-mGBP7^{K51A} Interaktion sowohl für PA als auch für CL detektierbar. Die Aufnahmen der mGBP7^G- und mGBP7^{Δ49}-Fusionsproteine zeigten das Vorhandensein und die Verteilung der Proteine um die GUVs, allerdings keine spezifische Interaktion mit den Lipiden. Der Marker entspricht 5 µm.

In Abbildung 37 wird die direkte Protein-Lipid-Interaktion der mGBP7-Mutanten zu Phosphatidsäure und Cardiolipin dargestellt. Auffällig war, dass die vorherigen Interaktionsergebnisse der mGBP7-Fusionsproteine zu PA und CL, trotz gleicher Vorgehensweise und Konditionen, wesentlich eindeutiger und stärker nachweisbar waren. Für die mGBP7^{ME}-, sowie mGBP7^{K51A}-Fusionsproteine

war eine Interaktion zu PA und CL detektierbar. Die mGBP7^G-Fusionsproteine wiesen das geringste Lipid-Interaktionspotential auf. Und auch die mGBP7-Mutante mit der Deletion der C-terminalen 49 Aminosäuren zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zu GFP-mGBP7, indem keine Interaktion an PA oder CL detektiert werden konnte. Die GFP-gekoppelten Proteine waren zwar im Hintergrund sichtbar, aber es war keine direkte Interaktion zwischen diesen und der TexasRed-gefärbten Lipiden in den GUVs zu detektieren. Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigten den Effekt von fehlenden mGBP7-Domänen oder Aminosäuren auf das mGBP7-Fusionsprotein bezüglich der Lipidinteraktion an PA und CL, sowie auf die intrazelluläre Lokalisation im Zellzytosol und an der *T. gondii*-PVM. Besonders auffällig war die nichtvorhandene Akkumulation an *T. gondii*-PVMs oder direkt an PA- und CL-Lipiden, sobald die mGBP7-E domain völlig oder zumindest teilweise fehlte. Entsprechend dieser Ergebnisse wurden für die nachfolgenden Untersuchungen zwei weitere Trunktationsmutanten für eine detailliertere Charakterisierung der C-terminalen mGBP7-Aminosäuren, hergestellt. Die GFP-fusionierten mGBP7^{Δ20}- und mGBP7^{Δ30}-Trunktationsmutanten wiesen eine Deletion der C-terminalen 20-, beziehungsweise 30 Aminosäuren auf (siehe 2.4.1.1) und wurden lentiviral in mGBP7-defiziente MEF Zelllinien transduziert. Die Analyse und Charakterisierung dieser Trunktationsproteine verlief vergleichsweise zu den vorherig behandelten mGBP7-Trunktationsmutanten.

a)



b)

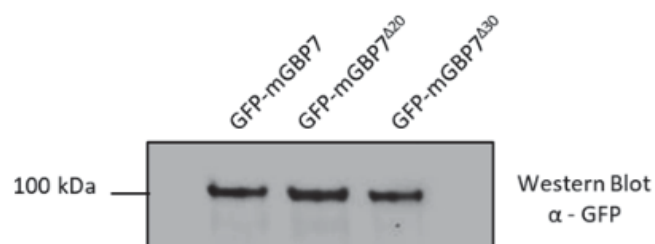


Abbildung 37: Nachweis der GFP-gekoppelten Deletionsmutanten mGBP7^{Δ20} und mGBP7^{Δ30}, isoliert und aufgereinigt aus transduzierten mGBP7^{-/-} MEFs, durch GFP-TRAP Beads (siehe 3.2.6). a) Schema der Deletionsmutanten mGBP7^{Δ20} und mGBP7^{Δ30} im Vergleich zu mGBP7. b) Nachweis der GFP-gekoppelten Deletionsmutanten durch einen Western Blot mit einem anti-GFP-Antikörper und einem sekundären Ziege-anti-Maus-Antikörper.

Diese isolierten und durch einen Western Blot charakterisierten GFP-gekoppelten Fusionsproteine wurden im Vergleich zu GFP-mGBP7 beziehungsweise zu GFP-mGBP7^{Δ49} mit *Membrane Lipid Strips* inkubiert (siehe 3.2.8), um spezifische Interaktionen mit Lipiden zu untersuchen.

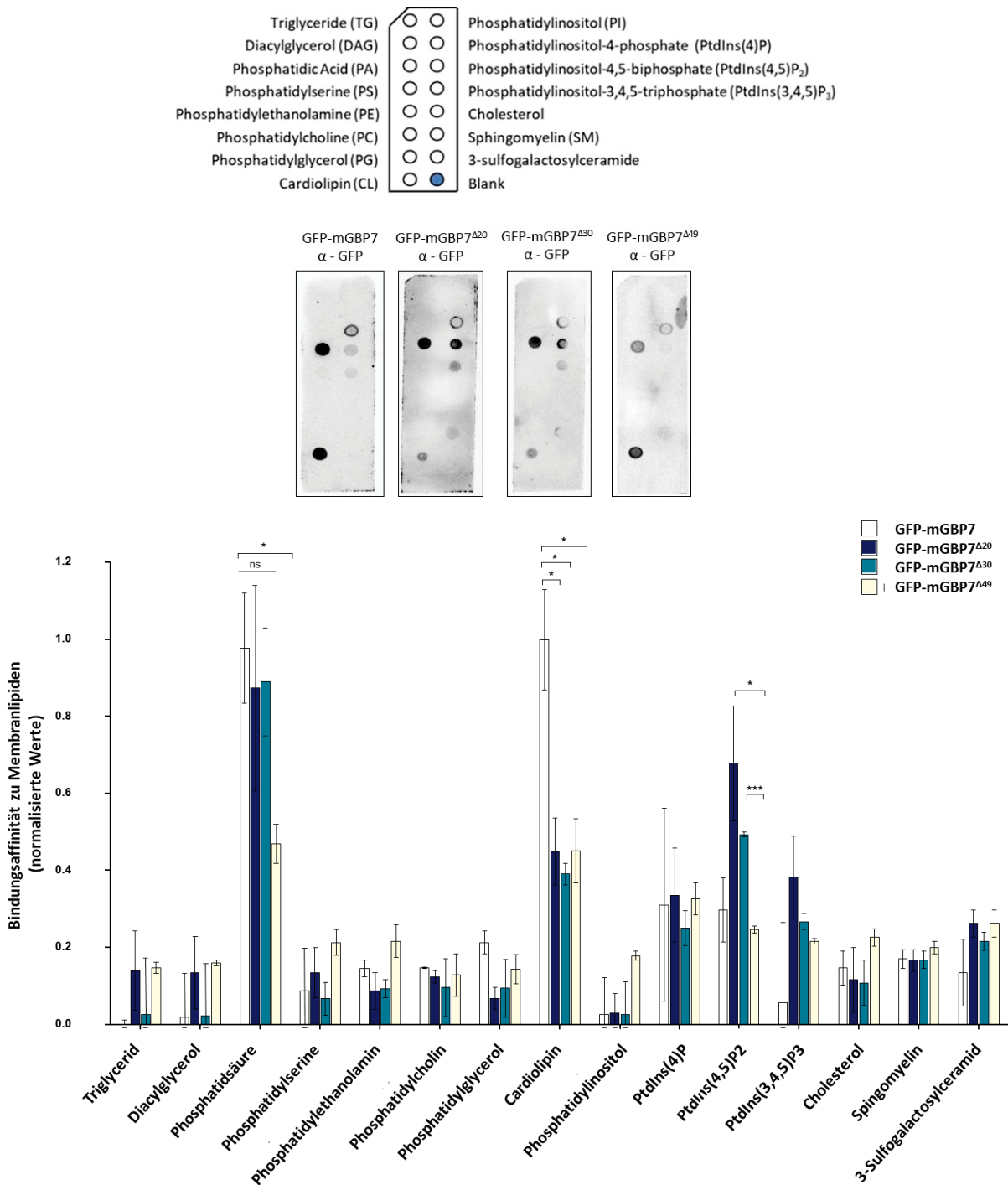


Abbildung 38: Auswertung von *Membrane Lipid Strips* bezüglich der Lipid-Interaktionen der Deletionsmutanten GFP-mGBP7^{Δ20} (Blau) und GFP-mGBP7^{Δ30} (Petrol) im Vergleich zum WT GFP-mGBP7 (Weiß) und der Deletionsmutante GFP-mGBP7^{Δ49} (Gelb). Für die Detektion der Lipid-Interaktion wurden ein Anti-GFP-Antikörper und ein sekundärer Ziege-anti-Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt, verwendet.

Die Auswertung der in Abbildung 38 dargestellten Ergebnisse veranschaulicht die potenziellen Lipid-Interaktionen der GFP-fusionierten Trunktionsmutanten mGBP7^{Δ20} und mGBP7^{Δ30}, ohne einen detektierbaren Effekt auf die PA-Interaktion im Vergleich zum vollständigen mGBP7-Fusionsprotein. Dieser Effekt wurde durch einen signifikanten Unterschied erst bei einer Deletion von 49 Aminosäuren ersichtlich. Eine Deletion von nur 20 Aminosäuren hatte hingegen signifikante Auswirkungen auf die Protein-Cardiolipin-Interaktion. Auffällig war zudem die erhöhte Lipid-Affinität

zu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ der $\text{mGBP7}^{\Delta 20}$ - und $\text{mGBP7}^{\Delta 30}$ -Fusionsproteine, welche zuvor bei den anderen Trunktionsmutanten sowie beim mGBP7 -Fusionsprotein (Abbildung 34) nicht beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung wurde im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter analysiert. Dennoch sollten weitere Experimente für eine Aufklärung dieses Phänomens durchgeführt werden. Nachfolgend wurde die *in vitro* Lokalisation der Trunktionsmutanten $\text{GFP-mGBP7}^{\Delta 20}$ und $\text{GFP-mGBP7}^{\Delta 30}$ im Vergleich zu GFP-mGBP7 und $\text{GFP-mGBP7}^{\Delta 49}$ konfokal-mikroskopisch untersucht und die *T. gondii*-Akkumulation gemäß der zuvor beschriebenen Methodik analysiert.

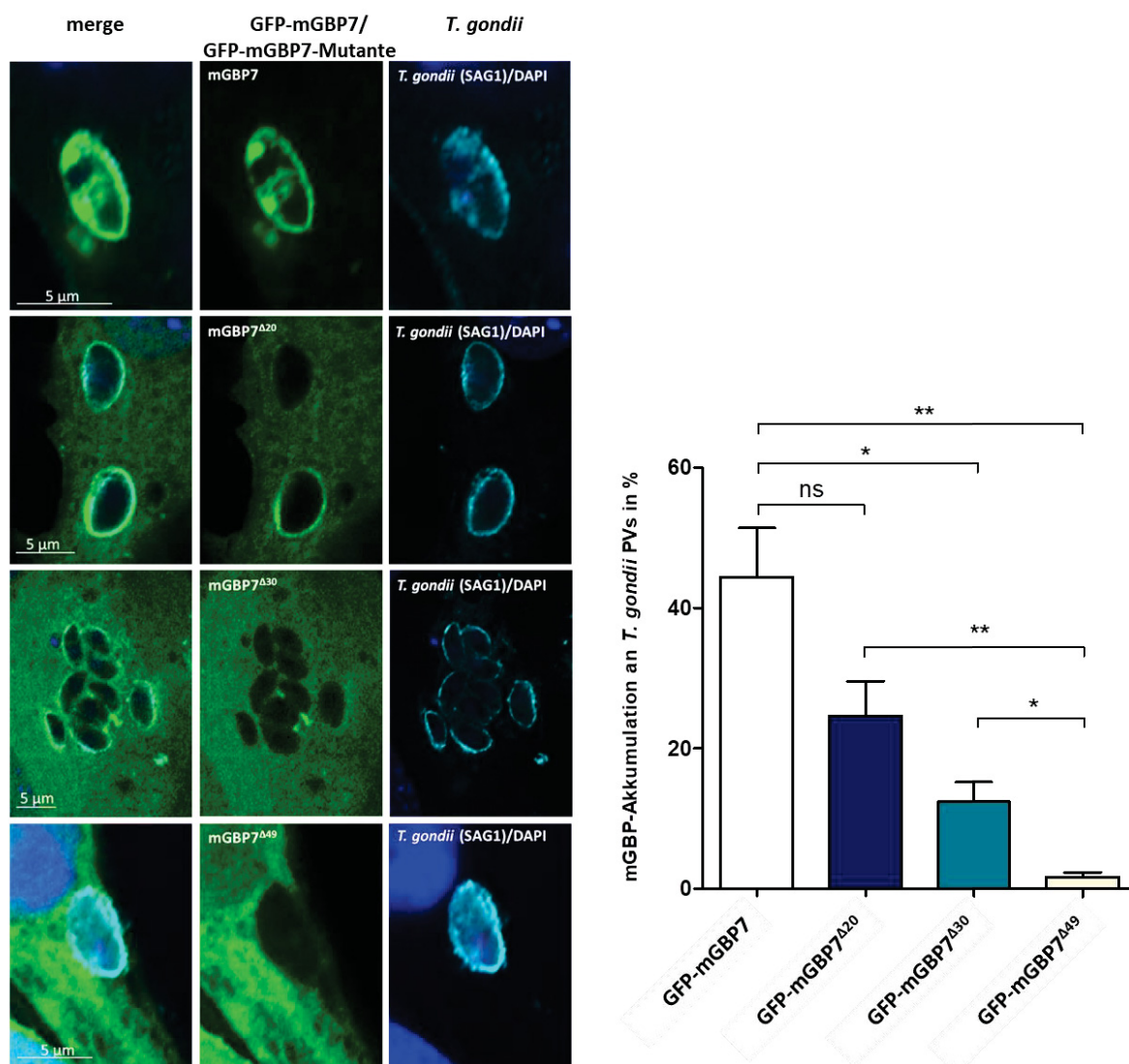


Abbildung 39: *In vitro* Lokalisation sowie quantitative Auswertung der mGBP-Akkumulation an *T. gondii*-PVMs der Deletionsmutanten $\text{GFP-mGBP7}^{\Delta 20}$ (Blau) und $\text{GFP-mGBP7}^{\Delta 30}$ (Petrol) im Vergleich zu GFP-mGBP7 (Weiß) und $\text{GFP-mGBP7}^{\Delta 49}$ (Gelb). Die *T. gondii*-Färbung wurde mittels anti-SAG1-Antikörper und AlexaFluor633-Antikörper gewährleistet. Der Marker entspricht 5 μm .

Die Ergebnisse der in Abbildung 39 dargestellten *in vitro* Lokalisation und *T. gondii*-Akkumulation der GFP-mGBP7 -Trunktionsmutaten im Vergleich zu GFP-mGBP7 zeigen, dass eine Deletion von 20 Aminosäuren zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zu GFP-mGBP7 führte. Bei einer Deletion von 30 Aminosäuren, wurde der Unterschied signifikant verschieden mit einer abnehmenden

Akkumulation zu *T. gondii*-PVs. Diese Werte unterschieden sich dennoch weiterhin signifikant zu den Werten der mGBP7^{Δ49}-Mutanten. Diese Ergebnisse wurden in Abbildung 40 zusammengestellt.

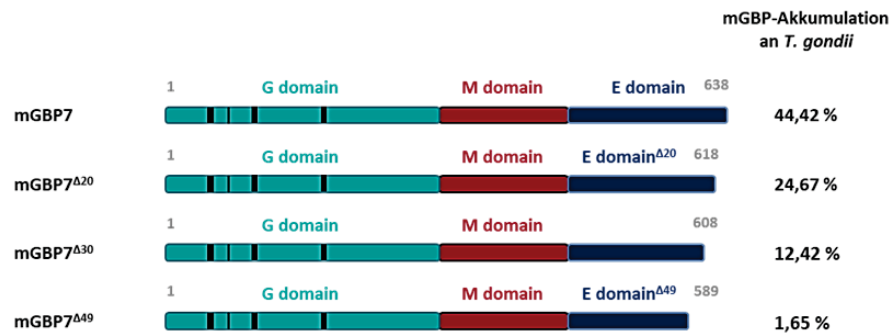


Abbildung 40: Zusammenstellung der *T. gondii*-Akkumulationsfrequenz der mGBP7-Deletionsmutanten (GFP-mGBP7^{Δ20}, GFP-mGBP7^{Δ30}, GFP-mGBP7^{Δ49}) im Vergleich zu GFP-mGBP7.

Zusammenfassend wurde anhand der Untersuchungen die Bedeutung der mGBP7 *E domain* und besonders der C-terminalen 49 Aminosäuren, für die Fähigkeit von mGBP7 an die *T. gondii*-PV zu rekrutieren, belegt. Die C-terminalen 49 Aminosäuren sind notwendig um eine spezifische Lipid-Interaktion zwischen den mGBP7-Fusionsproteinen zu Phosphatidsäure und Cardiolipin zu ermöglichen. Bei einem Verlust dieser 49 Aminosäuren, war eine Akkumulation der mGBP7-Fusionsproteine an die *T. gondii*-PVM nicht mehr nachweisbar. Die detaillierte Analyse der C-terminalen 49 Aminosäuren durch zwei weitere Trunkationsmutanten GFP-mGBP7^{Δ20} und GFP-mGBP7^{Δ30}, demonstrierte die unterschiedlichen Auswirkungen der Aminosäuren-Deletionen auf die PA- und CL-Protein-Interaktion. Folglich ist in den 49 C-terminalen Aminosäuren die mGBP7-Lipidbindestelle enthalten, die durch geeignete Deletionen und Punktmutationen zukünftig weiter analysiert werden muss.

5. Diskussion

Der intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist ein Beispiel für einen „erfolgreichen“ protozoischen Parasiten, der weltweit verbreitet ist. Es wird angenommen, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerung infiziert ist, davon etwa 30 – 50 % chronisch. Die Weltgesundheitsorganisation WHO schätzt, dass in Europa etwa 20 % der Krankheitslast der durch Lebensmittel übertragenen Krankheiten durch *T. gondii*-Infektionen bedingt sind (Havelaar et al., 2010; Montoya und Liesenfeld, 2004; Torgerson und Mastroiacovo, 2013). Anhand dieser Daten sind in Deutschland jährlich etwa 6 390 Infektionen während einer Schwangerschaft und 345 Infektionen bei Neugeborenen mit klinischen Symptomen zu erwarten, was die Anzahl der gemeldeten Fälle bei weitem übertrifft (Wilkling et al., 2016; Robert Koch Institut, 2018). Gründe für die Unterschiede zwischen erwarteter und reell gemeldeter Anzahl der Neuinfektionen sind die teilweise unauffälligen Symptome, die primär auf andere Krankheiten schließen lassen können und/oder eine Unterfassung des entsprechenden Meldesystems (Torgerson und Mastroiacovo, 2013). Die kongenitale Infektion, das heißt die transplazentare Parasitenübertragung zum Fötus bei einer erstmaligen Infektion während einer Schwangerschaft, wird von der Weltgesundheitsorganisation WHO mit einer jährlichen Fallzahl von 190 000 Kindern benannt und als eine „unterschätzte Belastung mit erheblichen Folgen“ eingestuft (Torgerson und Mastroiacovo, 2013).

Die STAT1-abhängige Transkription IFN γ -induzierter Effektorproteine führt zu der spezifischen Immunreaktion gegen *T. gondii*. Zu diesen IFN γ -induzierten Effektorproteinen gehören GTPasen, iNOS und IDO (Collazo et al., 2001; Darnell et al., 1994; Degrandi et al., 2007; Pestka et al., 1987; Pfefferkorn, 1984; Scharon-Kersten et al., 1997). Zu den Familien der GTPasen gehören die p65 Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) (Cheng und Townley, 1983; Cheng et al., 1985; Gupta et al., 1979). Sie vermitteln zellautonome Immunität (Degrandi et al., 2013; MacMicking, 2012; Meunier et al., 2015; Pilla et al., 2014) und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen prokaryotische und eukaryotische Pathogene (Degrandi et al., 2007; Janeway 2001; Haller et al., 2015; Carter et al., 2005; Kravets et al., 2016; Lindenberg et al., 2017; Steffens et al., akzeptiert). Eine Infektion durch *T. gondii* führt zu einem Wechselspiel verschiedener immunregulatorischer Mechanismen und Interaktionen, zu der Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden und der dadurch resultierenden Inhibition der Parasiten-Replikation mit dem finalen Abbau von *T. gondii*. Im Gegenzug konnte *T. gondii* evolutionär angepasste Reaktionen und Mechanismen entwickeln, die die Wirtsabwehr manipulieren und modulieren.

Die spezifische Rolle der GBPs während einer *T. gondii*-Infektion mit der Akkumulation an die PVM sowie der Abbau der Parasiten sind noch weitgehend ungeklärt. Auch der PV-Membranaufbau und die Lipid-Interaktionen der GBPs an dieser Membran sind bisher unbekannt.

Die vorliegende Forschungsarbeit behandelt Mitglieder des murinen GBP-Systems (mGBPs) und analysiert die Rekrutierungsdynamik verschiedener mGBPs an Pathogenmembranen am Beispiel des Infektionsmodells von *T. gondii*. Die anfänglich aufgestellten Ziele dieser Arbeit basierten auf den vorher bekannten Ergebnissen von mGBP7-defizienten Mäusen nach einer *T. gondii*-Infektion und der daraufhin beobachteten Mortalitätsrate (100 %) während der akuten Infektionsphase (siehe

Abschnitt 1.3.1, Abbildung 4, Steffens et al., akzeptiert). Vergleichsweise zeigten infizierte mGBP2-defiziente Mäuse eine Mortalitätsrate von circa 30 % während der akuten Infektion und von 70 % in der chronischen Phase, 60 Tage nach der *T. gondii*-Infektion. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich in mGBP7-defizienten Mäusen eine erhöhte Parasiten-Anzahl in der Milz, Leber und der peritonealen Flüssigkeit befand. Außerdem wurde eine gesteigerte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Entwicklung eines ausgeprägten Aszites durch Dr. C. Beuter-Gunia nachgewiesen (Steffens et al., akzeptiert). Diese Forschungsarbeit analysiert die spezifische mGBP-Akkumulation, insbesondere von mGBP7, an die *T. gondii*-PVM, die ausführliche Untersuchung von Kolo-kalisationen, detaillierte Rekrutierungs- und Akkumulationsanalysen mit weiteren Mitgliedern der mGBP-Familie, sowie spezifische Lipid-Interaktion im Vergleich zu mGBP2, welches im Gegensatz zu mGBP7 ein membraninteragierendes Isoprenylierungsmotiv aufweist.

5.1.1 Die Interaktion von mGBP7 mit dem obligat-intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii*

Die wichtigste Eigenschaft einer spezifischen Immunreaktion ist die Unterscheidung körpereigener und körperfremder Antigene, wie zum Beispiel die Erkennung eines körperfremden *T. gondii*-Parasiten während der Wirts-Zellinvasion. Durch verschiedene Immunsystem-spezifische Mechanismen, wie beispielsweise durch die PRR-Bindung an Pathogen-assoziierten molekularen Oberflächenmustern oder einer Detektion durch T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren, kann eine Erkennung von körperfremden Strukturen erfolgen (Bluestone et al., 2009; Boehm und Swann, 2014; Hoffmann et al., 1999; Janeway, 2001; Janeway und Medzhitov, 2002; Sugamura et al., 2004; Williams et al., 1991). In der Folge wird eine zelluläre Immunantwort mit der Produktion des Schlüsselzytokins Interferon- γ (IFN γ) durch CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen aktiviert. IFN γ aktiviert einen nachfolgenden JAK-STAT-Signalweg mit einer Transkription spezifischer Effektorproteine (Boehm et al., 1997; Briscoe et al., 1996; Darnell et al., 1994; Ealick et al., 1991; Greenlund et al., 1994; Ihle und Kerr, 1995; Kotenko et al., 1995; Schroder et al., 2004).

Die Interaktionsstudien von mGBP7 begannen mit *in vitro* Untersuchungen *via Live Cell Imaging Movies*. Dafür wurden durch Elektroporation mCherry-exprimierende ME49-Parasiten (*T. gondii* Typ II-Stamm) hergestellt und auf ihre Zellinvasion in mGBP7-defizienten MEF-Zellen, welche stabil GFP-gekoppelte mGBP7-Proteine konstitutiv exprimierten, analysiert. Die *Live Cell Imaging* Mikroskopie bietet die Möglichkeit, eine dynamische Interaktion der Fusionsproteine mit *T. gondii* in lebenden Zellen zu beobachten. Die in Abbildung 7 (siehe Abschnitt 4.1.1) dargestellten Aufnahmen zu den entsprechenden Beobachtungszeitpunkten des *Live Cell Imaging* Videos, zeigten eine Zellinvasion des mCherry-*T. gondii* und die darauffolgende Rekrutierung und Akkumulation des Effektorproteins GFP-mGBP7 an der *T. gondii*-PVM. Transduziertes GFP-mGBP7 benötigt kein IFN γ als Expressionsfaktor, da es konstitutiv unter der Kontrolle des EF1 α Promotors exprimiert wird. Dennoch wurden die Zellen 16 Stunden vor der *T. gondii*-Infektion mit IFN γ stimuliert, da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass heterolog exprimierte mGBPs für die Rekrutierung zur PV den IFN γ -Stimulus benötigen (Degrandi et al., 2007). Es ist bislang unklar, ob IFN γ in diesen Fällen zu einer Expression von akzessorischen Proteinen führt die für die Rekrutierung

zur PV essentiell sind. Die mGBP7-Lokalisation im Zellzytosol ist in Vesikel-ähnlichen Strukturen (VLS) im unifizierten Zustand vorzufinden. Erste Aufnahmen derartiger Strukturen mit Hilfe korrelativer Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) lassen vermuten, dass die VLS von einer Membran umgeben sind und die Protein-Lokalisation regulieren. Ähnliche Strukturen konnten auch für weitere mGBPs nachgewiesen werden (Kravets et al., 2016; Degrandi et al., 2013; Degrandi et al., 2007). Die Lokalisation dieser mGBP7-VLS nahe einer *T. gondii*-PV lässt vermuten, dass eine Fusion der VLS mit der PVM erfolgt, wodurch sich der Inhalt dieser entleert und in einer lokalen Akkumulation der Fusionsproteine an der *T. gondii*-PVM resultiert. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass sich an der PVM mGBP2-Proteinkomplexe bestehend aus bis zu 8 000 mGBP2-Protomeren ausbilden können (Kravets et al., 2016). In dieser Forschungsarbeit konnte ebenfalls eine deutliche Akkumulation von einer Vielzahl an mGBP7-Fusionsproteinen an der *T. gondii*-PVM beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.1.1, Abbildung 7, nach 110 Minuten Beobachtungszeit), sodass diese sich möglicherweise ebenso zu supramolekularen Komplexen an der PVM anordnen.

Als weitere mikroskopische Verfahrensmethode wurde die Airyscan Mikroskopie verwendet. Mit Hilfe dieser Methode kann eine höhere Photonenzahl bei einer gleichzeitigen Erhöhung des Signal-Rauschverhältnis detektiert werden, wodurch eine deutlichere Auflösung spezifischer Strukturen möglich ist (Huff, 2015; Muller und Enderlein, 2010; Sheppard et al., 2013; York et al., 2012). Bedingt durch das erhöhte Detektionsvermögen konnte die Lokalisation von GFP-mGBP7 an der *T. gondii*-PVM sowie *T. gondii*-Plasmamembran verdeutlicht werden (Abschnitt 4.1.1, Abbildung 8). Entsprechend sind Ruptur-Effekte der PV vorrausgegangen, wodurch das mGBP7-Fusionsprotein diese penetrieren, durch einen unbekanntem Mechanismus ins Vakuolenlumen eintreten und schließlich direkt an der Plasmamembran akkumulieren konnte. Dieser Mechanismus konnte auch für weitere mGBPs beschrieben werden (Kravets et al., 2016; Degrandi et al., 2012; Steffens et al., akzeptiert). Folglich wird vermutet, dass die mGBP7-Akkumulation einen direkten Einfluss auf die Integrität des Parasiten ausübt und zu einem verringerten Parasitenwachstum führt (Steffens et al., akzeptiert). Die hohe Mortalitätsrate mGBP7-defizienter Mäuse während einer *T. gondii*-Infektion bestätigt diese Vermutung (Abschnitt 1.3.1, Abbildung 4, Steffens et al., akzeptiert).

Anhand dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob mGBP7 direkt mit den Membranen interagiert und dabei die Integrität der PVM sowie Plasmamembran von *T. gondii* beeinflusst, oder ob hierfür weitere, mit mGBP7 interagierende Proteine notwendig sind und es sich um eine indirekte Beeinflussung handelt. Dieser Fragestellung wird im Verlauf dieser Diskussion weiter nachgegangen.

Eine Untersuchungsmethode dieser Fragestellung stellte die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) dar, welche in Kooperation mit der AG Hensel an der Universität Osnabrück ausgeführt wurde. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich lokal begrenzte Bereiche sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch zu analysieren. In dieser Forschungsarbeit wurden PV-akkumulierende mGBP7-Fusionsproteine konfokal-mikroskopisch lokalisiert und durch die Elektronenmikroskopie strukturell analysiert (Abschnitt 4.1.1, Abbildung 9). Entsprechend konnten die *T. gondii*-PV und daran akkumulierende Proteinstrukturen charakterisiert werden, wodurch eine Vielzahl an tubulären Strukturen visualisiert wurden (Abschnitt 4.1.1, Abbildung 9b), welche das konfokal-mikroskopisch detektierte GFP-Signal der transduzierten

mGBP7-Fusionsproteine emittierten. Es ist demnach denkbar, dass mGBP7-Proteine dichte, an der PVM-akkumulierende Proteinkomplexe ausbilden, welche eine tubuläre Struktur aufweisen. Diese Tubuli-Strukturen waren auch in weiteren CLEM-Aufnahmen detektierbar. Die in Abbildung 9c) und 9d) (siehe Abschnitt 4.1.1) dargestellten Aufnahmen zeigten erneut derartige Strukturen, direkt akkumulierend an der Plasmamembran des Parasiten. Die Wölbung dieser Membran (Abschnitt 4.1.1, Abbildung 9d), Oranger Pfeil) direkt bei den akkumulierenden tubulären Strukturen, lies auf einen direkten, durch die Tubuli-Strukturen ausgeübten Einfluss auf die Plasmamembran schließen. Erneut entsprachen die tubulären Strukturen den konfokal-mikroskopisch detektierten GFP-Signalen der mGBP7-Fusionsproteine. Allerdings war das GFP-Signal um die gesamte *T. gondii*-Plasmamembran lokalisiert, die tubulären Strukturen jedoch begrenzt auf eine Position. Konfokal-mikroskopisch werden nur die fusionierten GFP-Konstrukte an mGBP7 dargestellt und nicht das vollständige Protein. Es kann vermutet werden, dass die tubulären Strukturen größeren Mengen der oligomerisierten mGBP7-Proteinen und kolokalisierenden Interaktionsmolekülen entsprechen, aber nicht dem konfokal-mikroskopisch detektierten GFP. Des Weiteren könnte es sich um noch unbekannte Moleküle handeln, die durch mGBP7 an diese Position hin rekrutiert wurden. Dies bezüglich gibt es noch einige offene Fragen. In der Veröffentlichung von Shydlovskiy und Zienert wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von humanen GBP1 gezeigt. Sie berichten von ringförmigen und gestreckten, stäbchenähnlichen Strukturen (Shydlovskiy et al., 2017). Entsprechend besteht eine Möglichkeit, dass gewisse Konditionen wie das Vorhandensein von GTP, Dimerisierungsprozesse, Ansammlungen in VLS und die Interaktion mit anderen Molekülen, die strukturellen Eigenschaften der humanen und murinen GBPs beeinflusst. Um genauere Aussagen diesbezüglich zu fällen, sind weitere CLEM-Aufnahmen notwendig.

Zusammenfassend konnten direkte Akkumulationen von mGBP7 an der *T. gondii*-PVM, und nach einer Ruptur dieser, ebenfalls an der Plasmamembran von *T. gondii* nachgewiesen werden. In uninfizierten Zellen wurde mGBP7 in VLS im Zellzytosol vorgefunden. Mittels Elektronenmikroskopie konnten Tubuli-Strukturen, am Ort des GFP-Signals der konfokal-mikroskopisch detektierten GFP-mGBP7, nachgewiesen werden. Diese Strukturen könnten mGBP7-Proteinkomplexe darstellen, doch müssen diesbezüglich weitere CLEM-Untersuchungen an *T. gondii* infizierten mGBP7^{-/-} GFP-mGBP7 MEF-Zellen durchgeführt werden.

5.1.2 Kolokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und weiteren Mitgliedern der mGBP-Familie

Es ist bereits für mGBP2 bekannt, dass dieses Mitglied der mGBP-Familie hauptsächlich Homo-Oligomere und in geringer Menge Hetero-Oligomere mit mGBP1 und mGBP3 in VLS bildet. In diesen Komplexen kann es an die PVM des Parasiten akkumulieren (Kravets et al., 2016). Für mGBP7 konnte ebenfalls die Lokalisation in VLS und die Akkumulation an der PV-Membran sowie Plasmamembran nachgewiesen werden. Entsprechend entstand die Frage, ob mGBP7, ähnlich wie mGBP2, mit anderen mGBPs Protein-Kolokalisationen ausbildet und in VLS sowie direkt an den *T. gondii*-Membranen vorzufinden ist. Dies wurde anhand von drei mGBP-Mitgliedern untersucht, welche im murinen Genom auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert sind (Abschnitt 1.3,

Abbildung 2): mGBP2 mit einer C-terminalen CaaX-Seite (Isoprenylierungsmotiv), welche posttranslational durch eine Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Transferase modifiziert wird und in eine spezifischen Membraninteraktion resultiert (Cheng et al., 1991; Kravets et al., 2016; Praefcke et al., 1999; Prakash et al., 2000; Stickney und Buss, 2000); mGBP3, welches mit mGBP7 und mGBP2 auf dem Chromosom 3 im gleichen mGBP-Cluster vorliegt und eine hohe Sequenzidentität zu mGBP7 aufweist, jedoch kein Isoprenylierungsmotiv besitzt; und mit mGBP6, welches auf dem Chromosom 5 vorliegt und ebenfalls kein Isoprenylierungsmotiv aufweist. Für die Kolokalisationsanalysen zwischen den mGBP-Proteinen wurden doppelt transduzierte mGBP7^{-/-} MEF Zelllinien hergestellt. Innerhalb dieser Zelllinien war GFP stets N-terminal an mGBP7 gekoppelt und die weiteren, transduzierten mGBP-Proteine immer N-terminal mit mCherry fusioniert.

Kolokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und mGBP2

In vorherigen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass mGBP2 nach der Disruption oder Permeabilisierung der *T. gondii*-PVM direkt an die Plasmamembran akkumuliert (Degrandi et al., 2007; Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016). Dieser Mechanismus wird unterstützt durch die Formation großer mGBP2 - Multimere an der *T. gondii*-PV und der Interaktion von mGBP2 mit mGBP1 und mGBP3. *In vivo* Experimente verdeutlichten, dass mGBP2 - defiziente Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität in *T. gondii*-Infektionen aufzeigten und folglich eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von *T. gondii* einnimmt (Degrandi et al., 2013).

Die Untersuchungen dieser Forschungsarbeit mittels *Live Cell Imaging Movies*, Kolokalisations- und Korrelationsberechnungen sowie Daten aus Steffens et al., ergaben, dass mGBP2 und mGBP7 sich in verschiedenen VLS nach einer IFN γ -Stimulation in uninfizierten Zellen lokalisieren (Steffens et al., akzeptiert). Nach einer Infektion mit *T. gondii*, rekrutieren sowohl mGBP2 als auch mGBP7 an die *T. gondii*-PVM. Die Rekrutierungs-Mechanismen verlaufen durch unterschiedliche kinetische Prozesse, wobei nach zwei Stunden *T. gondii*-Infektion mGBP2 in hoher Dichte an die PVM rekrutiert ist und mGBP7 in geringerer Anzahl folgt (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 13 und Abbildung 15). Dieser Rekrutierungs-Verlauf wurde bestätigt durch die hochauflösende STED-Mikroskopie, die eine gemeinsame Akkumulation von mGBP2 und mGBP7 in ähnlicher Protein-Dichte an der *T. gondii*-PVM zu einem späten Infektionszeitpunkt (6 h nach der Infektion) zeigte, was zuvor durch die SIM-Mikroskopie und 2 h nach *T. gondii*-Infektion nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 12). Die detaillierte Rekrutierungs- und Akkumulationsanalyse von mGBP2 und mGBP7 in *T. gondii* infizierten, mGBP2- oder mGBP7-defizienten Zellen mit lentiviral transduzierten, fluoreszenten mGBPs und der Quantifizierung mGBP-positiver *T. gondii* ergab, dass die Rekrutierung und Akkumulation an den *T. gondii*-PVs von mGBP7 in Abwesenheit von mGBP2 signifikant reduziert ist (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 14). Diese signifikante Reduktion vom transduzierten mGBP7 wurde aufgelöst, sobald mGBP2 in die mGBP2-defiziente Zelllinie rekonstituiert wurde. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass zwischen mGBP2 und mGBP7 eine Rekrutierungs-Hierarchie besteht, in der mGBP2 primär an die *T. gondii*-PVM rekrutiert und somit die Rekrutierung und Akkumulation vom sekundären, nachfolgenden mGBP7 und dessen antimikrobielle Funktion, beeinflusst. Die hauptsächliche und primäre Anlagerung von mGBP2 verläuft innerhalb der ersten 90 Minuten nach der *T. gondii*-Infektion, woraufhin die Akkumulation von mGBP7 zunimmt

und nachfolgend beide Proteine an der *T. gondii*-PVM und ebenfalls direkt an der *T. gondii*-Plasmamembran lokalisieren. In Anbetracht der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.1, Abbildung 7, wirken diese Erkenntnisse überraschend. In Abbildung 7 konnte die Rekrutierung und Akkumulation direkt an der *T. gondii*-PV des mCherry exprimierenden Parasiten von GFP-mGBP7 im *Live Cell Imaging Movie* beobachtet werden. Anhand der Aufnahmen ist davon auszugehen, dass mGBP7 nach circa 88 Minuten Beobachtungszeit die *T. gondii*-Akkumulation in hoher Protein-Dichte vollzieht. Innerhalb dieser Untersuchungen war nur GFP-mGBP7 mit Fluoreszenz markiert, weswegen keine weiteren mGBP-Mitglieder konfokal-mikroskopisch detektiert werden konnten. Der genaue Invasionszeitpunkt von mCherry-*T. gondii* in die Zelle ist anhand der Aufnahmen nur spekulativ aber nicht definitiv festzustellen. Allerdings ist aufgrund der Rekrutierungs- und Akkumulationsdaten aus Abschnitt 4.1.2 von mGBP7 und mGBP2 zu vermuten, dass bereits kurzzeitig nach der Zellinvasion von *T. gondii*, andere, nicht-fluoreszierende mGBP-Familienmitglieder und Interaktionsmoleküle an der PV lokalisierten. Die Daten aus dieser Studie lassen darauf schließen, dass eines dieser PVM-Interaktionsmoleküle das endogene mGBP2 sein wird. In Anbetracht dieser Erkenntnisse sollte erwähnt werden, dass für das humane Ortholog zu mGBP2, hGBP1, bereits eine fördernde Ko-Rekrutierung von hGBP2, hGBP3, hGBP4 und hGBP6 in *Shigella flexneri* in HeLa-Zellen beschrieben werden konnte (Piro et al., 2017; Wandel et al., 2017). Diese Ergebnisse sprechen für das Vorhandensein einer Rekrutierungs-Hierarchie zu Pathogenen und einer spezifischen Eigenschaft von GBPs in verschiedenen Spezies und Infektionen.

Ein Grund für eine primäre mGBP2-Rekrutierung an *T. gondii*-PVs kann unter anderem das Vorhandensein des mGBP2-Isoprenylierungsmotivs sein. Das Isoprenylierungsmotiv CaaX wird von Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Transferasen erkannt und modifiziert, wodurch eine direkte Membranbindung gefördert wird (Stickney und Buss, 2000; Kravets et al., 2016, Cheng et al., 1991; Praefcke et al., 1999; Prakash et al., 2000). In Degrandi et al. wurde die Isoprenylierung des C-terminus detailliert mittels Punktmutation der mGBP2-Isoprenylierungs-Erkennungssequenz und der Herstellung von chimären Proteinen aus der G Domäne von mGBP5 (lokalisiert auf Chromosom 3 mit Isoprenylierungsmotiv) und der C-terminalen Region von mGBP2 (mGBP5-2-Protein), sowie die umgekehrte Version aus der G Domäne von mGBP2 und der C-terminalen Region von mGBP5 (mGBP2-5-Protein) analysiert (Degrandi et al., 2013). Die Punktmutation bewirkte eine fehlerhafte subzelluläre Verteilung im Zytosol, als auch die nicht mehr vorhandene Akkumulation von mGBP2 an PVs. Die chimären Proteine mGBP2-5 und mGBP5-2 zeigten ebenfalls keine Lokalisation in VLS im Zytosol sowie keine Akkumulationen an *T. gondii*-PVs. Die isolierte Übertragung des C-terminalen Isoprenylierungsmotivs von mGBP5 an das GFP-mGBP2 Fusionsprotein führte erneut zur Lokalisation an *T. gondii*-PVs (Degrandi et al., 2013). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass das C-terminale Isoprenylierungsmotiv essenziell für die mGBP2-Rekrutierung an *T. gondii* ist und die C-terminale mGBP2 E Domäne eine wichtige Funktion in der stabilen Akkumulation von mGBP2 an *T. gondii* einnimmt. Im Gegenzug beinhaltet das mGBP7 kein Isoprenylierungsmotiv. Die dargestellten Ergebnisse, und insbesondere die hochauflösenden Mikroskopie-Technologien (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 12), lassen anhand der direkten Akkumulation von mGBP2 an der PVM (besonders ersichtlich in der STED-Aufnahme, Abbildung 12b)) und der lokalen Verteilung von mGBP7 innerhalb

des dichten mGBP2-Netzwerkes darauf deuten, dass mGBP7 zunächst mit dem bereits primär an der *T. gondii*-PVM akkumulierenden mGBP2 interagiert, und erst dann direkt an die Membran rekrutiert. In Bezug auf *in vivo* Mauseinfektionsmodelle *T. gondii* infizierter mGBP2- und mGBP7-defizienter Mäuse (siehe Abschnitt 1.3.1, Abbildung 4), kann diese Analyse hypothetische Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen mGBPs innerhalb einer *T. gondii*-Infektion liefern. Die mGBP7-defizienten Mäuse zeigten eine Mortalitätsrate von 100 % in der akuten Infektionsphase, die mGBP2-defizienten Mäuse von 30 % in der akuten Infektionsphase an Tag 10 und von circa 70 % in der nachfolgenden chronischen Infektionsphase. Demnach stellt sich die Frage, wodurch die vollständige Mortalität der mGBP7-defizienten Mäuse und die vergleichsweise stärkere Immunität der mGBP2-defizienten Mäuse während einer *T. gondii*-Infektion auftrat, wenn in dieser Forschungsarbeit die essenzielle Beeinflussung durch mGBP2 auf die Rekrutierung und Akkumulation von mGBP7 an *T. gondii*-PVMs gezeigt werden konnte. Eine Erklärung dieser Daten könnte zum einen die Größe von mGBP2 mit 589 Aminosäuren sein, welche im Vergleich zu mGBP7 um 49 Aminosäuren kleiner ist. Kleinere Proteine weisen in der Regel eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit auf. Es gilt, je größer die Struktur und der Radius eines Moleküls, desto größer ist der Widerstand. Wahrscheinlicher ist allerdings ein aktiver Protein-Transport. Ein aktiver Transport beschreibt einen unter Energieverbrauch verlaufenden Transport von Proteinen, wofür die GTP-Hydrolyse von GTP zu GDP und GMP sprechen würde. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die GTP-Hydrolyse ein essenzieller Bestandteil für die mGBP2-Rekrutierung in infizierten Zelllinien zu *T. gondii*-PVs darstellt (Kravets et al., 2012), was innerhalb dieser Forschungsarbeit für mGBP7, mit Blick auf die K51A-Mutante und der fehlenden GTP-Hydrolyse aber der dennoch vorhandenen Rekrutierung und Akkumulation an die *T. gondii*-PVM (siehe Abschnitt 4.3, Abbildung 33 und 35), nicht nachgewiesen werden konnte. Entsprechend ist der detaillierte Transportweg der mGBPs, insbesondere von mGBP7, zu den *T. gondii*-PVs bislang unklar. Der wahrscheinlichste Grund für die unterschiedliche Rekrutierungs-Geschwindigkeit von mGBP2 und mGBP7 ist vermutlich der aktive Protein-Transport von mGBP2 und die evolutionär bedingte Ausbildung der CaaX-Box, welche nur bei drei von insgesamt elf mGBPs nachweisbar ist (Degrandi et al., 2007). Wie zuvor erwähnt, dient das Isoprenylierungsmotiv von mGBP2 funktionell der Interaktion an Membranen. In vorherigen Arbeiten, als auch innerhalb dieser Forschungsarbeit, konnte die funktionelle Membranakkumulation der mGBP2-Proteine nachgewiesen werden (Kravets et al., 2012, Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2016, Steffens et al., akzeptiert). Diese Akkumulation verlief im direkten Vergleich zu mGBP7 in doppelt transduzierten Zelllinien schneller und effektiver. Eine ähnliche Funktion wurde ebenfalls für das isoprenylierte mGBP1 in *T. gondii*-Infektionen festgestellt (Selleck et al., 2013; Yamamoto et al., 2012; Degrandi et al., 2013). Die Daten deuten darauf hin, dass eine Akkumulation dieser mGBPs an der *T. gondii*-PVM zu einer Destabilisierung oder PV-Ruptur führen. Wie bereits zuvor erwähnt, konnte das nachfolgende, sekundär akkumulierende mGBP7 die destabilisierte PVM penetrieren und direkt an der *T. gondii*-Plasmamembran akkumulieren. Aufgrund der Ergebnisse dieser Forschungsarbeit und bezüglich des Infektionsmodells *in vivo* (siehe Abschnitt 1.3.1, Abbildung 4, Steffens et al., akzeptiert), wird dennoch die essenzielle Rolle von mGBP7 während der *T. gondii*-Infektion gezeigt. Entsprechend kann vermutet werden, dass mGBP7 der entscheidende Faktor für den *T. gondii*-Abbau darstellt.

Einige Ergebnisse sprechen für die Theorie der Rekrutierungs- und Akkumulationsordnung, bei der mGBP2 als ein notwendiger Faktor für die mGBP7-Akkumulation an der *T. gondii*-PVM agiert. Bei einer Abwesenheit von mGBP2 ist eine signifikant reduzierte Akkumulation von mGBP7 detektierbar (siehe Abschnitt 4.1.2., Abbildung 14), doch besteht kein vollständiger Akkumulationsverlust. Bei einem Fehlen von mGBP2, welches daraufhin keine Destabilisierung der PVM durch einen unbekanntem Mechanismus durchführen kann, verlangsamt sich die Rekrutierung und Akkumulation von mGBP7. Weitere Daten zeigen die nicht-vollständige Letalität der mGBP2-defizienten Mäuse während einer *T. gondii*-Infektion. Die Mausmortalitätsrate verdeutlicht die bedeutende Effektivität von mGBP2 in der Immunreaktion gegen *T. gondii*, dennoch scheinen andere Faktoren für die vollständige Kontrolle der parasitären Replikation als auch für den Abbau des Parasiten notwendig zu sein. Bei einer Mortalitätsrate der mGBP2-defizienten Tiere von 30 % während der akuten Infektionsphase, war eine Kontrolle der *T. gondii*-Replikation noch weitestgehend gewährleistet. Dieser Zustand änderte sich mit der chronischen Infektionsphase mit *T. gondii*-Bradyzoiten. Die Immunreaktion gegen *T. gondii* war in dieser Phase nicht mehr ausreichend und „zu langsam“, wodurch eine Mortalitätsrate von 70 % entstand. Dies könnte für eine reduzierte Rekrutierungsgeschwindigkeit und für eine verminderte Akkumulation von mGBP7 ohne mGBP2 sprechen. Bei einer Abwesenheit von mGBP7 starben alle infizierten Mäuse binnen 10 Tage nach der *T. gondii*-Infektion, trotz der effektiven Rekrutierung und Akkumulation von mGBP2. Ein weiteres Argument für diese Hypothese sind die Daten von Yamamoto et al. Die Rekonstitution von mGBP7 *in vitro* in mGBP^{Chr3}-defizienten Zellen, mit einer Deletion aller Chromosom 3 lokalisierten mGBPs, konnte die Kontrolle der *T. gondii*-Proliferation erneut gewährleisten, die Rekonstitution von mGBP2 war diesbezüglich nicht ausreichend (Yamamoto et al., 2012).

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass mGBP2 eine wichtige Funktion in der *T. gondii*-Infektion einnimmt. Es beeinflusst die Rekrutierung von mGBP7 und ist vermutlich für die Destabilisierung der PV-Membran durch eine schnelle Verankerung mit einem assoziierten C-terminalen Isoprenylierungsmotiv verantwortlich. Die effektive Einleitung des *T. gondii*-Abbaus erfolgt vermutlich durch mGBP7.

Kolokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und mGBP3

Die nachfolgende Kolokalisationsstudie wurde mit lentiviral transduzierten mGBP7- und mGBP3-exprimierten Zellen durchgeführt. Bis auf eine lokale Interaktion in geringen Mengen mit mGBP2 in VLS, sind bisher nur wenige Erkenntnisse über das mGBP3-Protein vorhanden (Kravets et al., 2016). Die Untersuchungen an mGBP7 mit mGBP3 ergaben eine nahezu vollständige Kolokalisation und Ko-Rekrutierung aller Fusionsproteine zu der *T. gondii*-PVM. In den gezeigten *Live Cell Imaging* Aufnahmen (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 17) war bereits zu Beginn der Beobachtungszeit ein hohes Maß an Kolokalisation von mGBP3 mit mGBP7 innerhalb des Zytosols in VLS in der uninfizierten Zelle zu erkennen. Nach einer *T. gondii*-Infektion war die synergistische Akkumulation beider transduzierten mGBPs an der *T. gondii*-PVM nachweisbar. Die Aufnahmen nach 128 Minuten Beobachtungszeit und einer sichtbaren Anlagerung der Fusionsproteine direkt an der *T. gondii*-Plasmamembran, deuten auf einen Aufbruch und entsprechend auf eine Destabilisierung der *T. gondii*-PVM (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 17b)). Die Auswertungen der

Protein-Kolokalisation sowie Korrelation mittels Pearson's Korrelationskoeffizient zeigten Werte über 0,6, welcher dreifach erhöht zu mGBP7 mit mGBP2 war und damit einen linearen Zusammenhang zwischen mGBP3 und mGBP7 aufzeigt (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 17 im Vergleich zu Abbildung 11). Die synergistische Rekrutierung an der PVM sowie direkt an der *T. gondii*-Plasmamembran von mGBP7 und mGBP3 konnten mittels hochauflösender STED-Mikroskopie bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.1.2., Abbildung 18).

Nachfolgend stellt sich die Frage, wieso mGBP7 in diesen Untersuchungen deutliche Rekrutierungs- und Akkumulationseffekte zu Beginn der *Live Cell Imaging* Aufnahmen aufwies, aber in vorherigen Analysen mit dem fluoreszierenden mGBP2-Proteinen als sekundär-akkumulierendes Protein gekennzeichnet werden konnte. Innerhalb dieser Untersuchungen wurde der Fokus einzig und allein auf mGBP3 und mGBP7 gelegt, welche lentiviral transduziert worden sind. Das endogen exprimierte mGBP2 wurde nicht fluoreszent markiert und entsprechend auch nicht in den durchgeführten Untersuchungen berücksichtigt. Bedingt durch die vorherigen Ergebnisse ist allerdings anzunehmen, dass bereits eine Akkumulation der endogen exprimierten mGBP2-Proteine an der *T. gondii*-PVM vorhanden war. Spekulativ könnten diese Akkumulation dazu beigetragen haben, dass die PV-Membran während der *Live Cell Imaging* Aufnahmen destabilisiert wurde und schließlich aufriss, sodass nachfolgend die mGBP7- und mGBP3-Proteine an der Plasmamembran des Parasiten akkumulieren konnten (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 17b), 128 Minuten Beobachtungszeit).

Eine detaillierte Quantifizierung der mGBP-Rekrutierung und –Akkumulation an *T. gondii* zeigte, im Gegensatz zu mGBP7 mit mGBP2, über den Zeitraum von drei Stunden keine signifikanten Veränderungen (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 20). In den mGBP3 und mGBP7 doppelt-transduzierten Zelllinien konnte bereits zu Beginn der Infektion eine hohe Anzahl *T. gondii* PVs gezählt werden, die sowohl für mGBP3 als auch für mGBP7 positiv waren. Diese war deutlich höher als zu den einzeln mGBP-positive *T. gondii*-PVs (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 21). Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass diese mGBPs ähnliche Funktionen innerhalb der mGBP-Rekrutierungshierarchie aufweisen. Dafür würden die strukturellen Eigenschaften (kein Isoprenylierungsmotiv), die phylogenetische Einordnung in dem gleichen Cluster auf Chromosom 3, sowie die prozentual ähnliche Akkumulationsfrequenz an *T. gondii*-PVMs und die dennoch vorhandene, isolierte und vom anderen mGBPs unabhängige mGBP3 und mGBP7 *T. gondii*-Akkumulation sprechen (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 22). Um diese Hypothese zu untersuchen, wären *in vivo* Infektionsstudien mit mGBP3-defizienten Mäusen und Toxoplasmen durchzuführen. Anhand des Verlaufs des Maus-Infektionsexperiments wäre es möglich, vergleichende Schlüsse zu den bereits durchgeführten *in vivo* Experimenten zu ziehen. *In vitro* wären ebenfalls Rekrutierungs- und Akkumulationsanalysen von mGBP2 und mGBP3 sinnvoll, damit die Funktion dieser beiden Proteine analysiert und vergleichend zu mGBP2 mit mGBP7 betrachtet werden könnten.

Kolokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und mGBP6

Das mGBP6-Protein wurde bislang nur wenig untersucht. In einer Versuchsreihe zur Analyse der Rekrutierung von mGBPs an *Chlamydia trachomatis* Inklusionen und an *T. gondii*-PVs in NIH3T3 Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass in Bezug auf *T. gondii* mGBP6 eine relativ erhöhte Akkumulationsfrequenz im Vergleich zu den *C. trachomatis* Inklusionen aufwies (Lindenberg et al.,

2017). Entsprechend galt dieses Protein unserem Interesse und wurde für weitere Kolokalisationsanalysen mit mGBP7 lentiviral in mGBP7-defiziente MEFs transduziert. Anhand der *Live Cell Imaging* Aufnahmen konnten zwei verschiedene Akkumulations-Kinetiken von mGBP7 und mGBP6 an *T. gondii*-PVMs gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 24). Die mGBP-Akkumulation an den *T. gondii*-PVs verhielt sich in einigen Experimenten, vergleichend zu vorherigen Aufnahmen mit weiteren mGBP-Familienmitgliedern, atypisch (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 24a)). *T. gondii* schien die PVM mit den daran akkumulierenden mGBPs abzustößen. Dieses Phänomen konnte wiederholt für die Akkumulation von mGBP7 mit mGBP6 an *T. gondii*-PVs nachgewiesen werden. Einige Ausnahmen zeigten die typische, bereits von anderen mGBPs bekannte Akkumulation an der *T. gondii*-PVM (siehe Abschnitt 4.1.2, Abbildung 24b)). Der „PVM-Abwurf“ beschreibt vielmehr das Aufreißen der PV, was folglich dazu führt, dass *T. gondii* ohne schützende PV frei im Zytosol vorliegt und eine Replikation innerhalb der PV nicht mehr möglich ist. Entsprechend können womöglich weitere Abwehrmechanismen direkt gegen *T. gondii* agieren.

Die Auswertung dieser Ergebnisse ergab, dass mGBP7 und mGBP6 kolokalisierend an der PVM sowie direkt an der *T. gondii*-Plasmamembran vorliegen können. Eine derartige Kolokalisation von mGBP7 mit mGBP6 im Zytosol konnte innerhalb dieser Forschungsarbeit in infizierten Zellen mit einem Pearson's Korrelationswert von circa 0,3 beschrieben werden, welcher im Vergleich zu den stark kolokalisierenden mGBP7 mit mGBP3, um die Hälfte reduzierte Werte aufzeigt (Abschnitt 4.1.2, Abbildung 24c)). Anders ist es in uninfizierten Zellen, in denen mGBP7 und mGBP6 deutlich kolokalisierend in VLS vorliegen (Steffens et al., akzeptiert). Die STED-Mikroskopie konnte die enge Lokalisation beider Fusionsproteine um die *T. gondii*-PVM darstellen, welche vergleichbar zu der Kolokalisation zwischen mGBP7 und mGBP3 war (Abschnitt 4.1.2, Abbildung 25). Auch in diesem Fall war die Lokalisation der Fusionsproteine nicht direkt an der PVM des *T. gondii* detektierbar, wie zuvor bei mGBP2 (Abschnitt 4.1.2, Abbildung 12b)). Innerhalb dieser Forschungsarbeit war demnach mGBP2 das einzig detektierte Fusionsprotein mit dieser direkten Assoziation an der PV-Membran, was die Theorie der primären Rekrutierung von mGBP2 und nachfolgenden sekundären Rekrutierungen weiterer mGBPs unterstützt.

Eine Quantifizierung des gegenseitigen Einflusses von den Fusionsproteinen mGBP7 und mGBP6 auf die Rekrutierung zur *T. gondii*-PV wurde nicht durchgeführt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass mGBP6 unabhängig von mGBP7 an die *T. gondii*-PVM akkumulieren konnte (Abschnitt 4.1.2, Abbildung 26).

Eine detaillierte Untersuchung der auf Chromosom 5 kodierten mGBPs in einer *T. gondii*-Infektion ist von großem Interesse, da anhand dieser Daten und den bereits publizierten Daten von mGBP6 (Lindenberg et al., 2017), zumindest mGBP6 eine effektive Akkumulation sowohl unabhängig von mGBP7, als auch bei einem Vorhandensein von mGBP7 mit diesem mGBP kolokalisierend, an der *T. gondii*-PVM sowie an der Plasmamembran von *T. gondii* aufweist und wahrscheinlich zu einer Kontrolle der parasitären Replikation *in vitro* beitragen kann. Die mGBP6-mGBP7-Kolokalisation ist ebenfalls im Zytosol, geringer in *T. gondii* infizierten Zellen, aber insbesondere in uninfizierten Zellen (Steffens et al., akzeptiert) nachweisbar.

5.2. Interaktionsanalyse von mGBP2 und mGBP7 mit Membranlipiden

Die vorgelegten Ergebnisse dieser Forschungsarbeit aus Abschnitt 4.1.2, sowie die vorherigen Untersuchungen an mGBP2 (Kravets et al., 2016; Degrandi et al., 2013; Kravets et al., 2012; Degrandi et al., 2007), zeigen die wichtige Funktion von mGBP2 in der Immunreaktion gegen *T. gondii*. Zudem konnte anhand eines *in vivo* Infektionsmodells und durch die dargestellten *in vitro* Untersuchungen in dieser Forschungsarbeit (Abschnitt 4.1), die essenzielle Rolle von mGBP7 während einer *T. gondii*-Infektion belegt werden. Neben der Akkumulation beider Proteine an die *T. gondii*-PVM und Plasmamembran war besonders für mGBP7, aber auch für mGBP2, eine Funktion als Kontrollmechanismus bei der *T. gondii*-Replikation zugeschrieben worden. Dieser Mechanismus als auch die Membran-Akkumulationen sowie der mGBP-abhängige parasitäre Abbau, sind noch weitgehend unklar. Um diese noch unbekanntenen Mechanismen genauer verstehen zu können, galt der nachfolgende Abschnitt dieser Forschungsarbeit der Aufklärung der mGBP-Membraninteraktion. Wie bereits erläutert, unterscheiden sich mGBP2 und mGBP7 strukturell voneinander bedingt durch unterschiedliche Aminosäuren-Anzahlen sowie durch das in mGBP2-enthaltende C-terminale Isoprenylierungsmotiv (CaaX-Box) (Abschnitt 4.2, Abbildung 27a)). Dieser Isoprenylierungsstelle wird eine direkte Membraninteraktion zugeschrieben (Cheng et al., 1991; Kravets et al., 2016; Praefcke et al., 1999; Prakash et al., 2000; Stickney und Buss, 2000). Da die Sequenz von mGBP7 keine CaaX-Box enthält, stellt sich die Frage, ob für dieses Protein eine direkte Membran-Interaktion überhaupt besteht, oder ob dies nur bedingt durch andere, interagierende Moleküle passiv möglich ist. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die N-terminal GFP-gekoppelten mGBP2- und mGBP7-Proteine mit Hilfe von anti-GFP V_HH-gekoppelten Agarosebeads aus lentiviral transduzierten Zellen isoliert und für weiterführende Experimente eingesetzt. Nach der Untersuchung der GTP-Hydrolyse mittels GTPase Aktivitätsmessungen (Kravets et al., 2012; Legewie et al., 2019), wobei für gereinigtes GFP-mGBP2 als auch für GFP-mGBP7 starke Hydrolyse-Fähigkeiten nachgewiesen werden konnten (Abschnitt 4.2, Abbildung 27), wurden die Fusionskonstrukte für eine Detektion potenzieller Lipid-Affinitäten mit *Membrane Lipid Strips* inkubiert und analysiert (Abschnitt 4.2, Abbildung 28). Die Lipid-Zusammensetzung der *T. gondii*-PVM und Plasmamembran sind noch weitgehend unbekannt. Entsprechend könnten Lipid-Affinitäten der mGBPs einen ersten Hinweis auf potenzielle *T. gondii*-Membranlipide liefern. Auf diesen *Lipid Strips* befinden sich 15 verschiedene, häufig auftretende Membranlipide in einer Konzentration von 100 pmol. Damit ist die Konzentration der untersuchten Lipide äußerst hoch, sodass die Ergebnisse der *Lipid Strips* noch mit Vorsicht betrachtet werden müssen, da diese häufiger zu falsch positiven Ergebnissen führen (Shirey et al., 2016). Die isolierten und aktiven GFP-gekoppelten Proteine wurden mit den beschriebenen *Membran Lipid Strips* inkubiert und die Bindung von Lipiden detektiert. Als Kontrolle wurde das isolierte und aufgereinigte GFP-Protein verwendet, welches keinerlei Lipid-Affinitäten aufwies. Für GFP-mGBP2 und GFP-mGBP7 konnten signifikante Lipidinteraktionen mit Phosphatidsäure (PA) und Cardiolipin (CL) detektiert werden. Zudem wurde in beiden Fällen eine geringe, signifikant erhöhte Affinität für Phosphatidylinositol-4-phosphat (PtdIns(4)P) nachgewiesen, welche im weiteren Verlauf nicht weiter behandelt wurde.

Das Glycerophospholipid PA besteht aus einem 1,2-Diacylglycerol mit einer veresterten Phosphatgruppe an der C3-Position und zwei gesättigten Fettsäuren an der C1- und C2-Position.

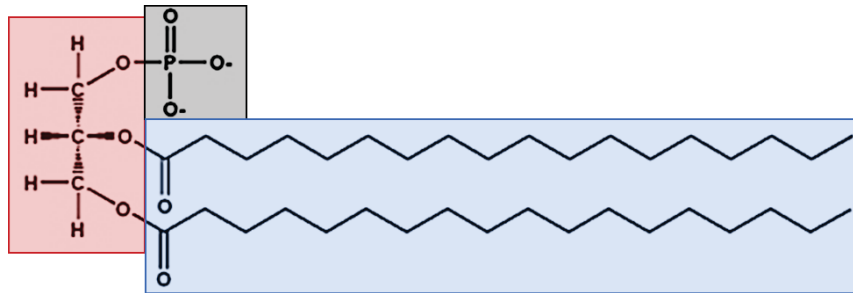


Abbildung 41: Die Struktur von PA. Dieses Glycerophospholipid ist aufgebaut aus Glycerin (Rot), das mit zwei C18-gesättigten Fettsäuren (Blau) an der C1- und C2-Position verestert ist. An der C3-Position befindet sich eine Phosphatgruppe (Schwarz) (modifiziert nach: Biochemie-Vorlesungen von Dr. Michael Blaber, *Lecture 13, Lipids*).

PA ist nur zu 1 % aller Phospholipide in biologischen Membranen vertreten (Buckland und Wilton, 2000). Dennoch ist dieses Phospholipid von physiologischer Wichtigkeit: Es spielt eine wichtige Rolle bei vesikulären Transporten, bei der Signaltransduktion und bei der Organisation des Zytoskeletts und der Zellproliferation (Athenstaedt und Daum, 1999; Pleskot et al., 2013; Yang und Frohman, 2012). Die Umgestaltung von Membranen verläuft durch die Änderung biophysiologicaler und chemischer Eigenschaften (Jang et al., 2012; Yang et al., 2008). Außerdem ist PA ein wichtiger Faktor für die Membrankrümmung (Cambrea und Hovis, 2007). Die meisten Funktionen von PA entstehen durch Bindungen mit Effektormolekülen, wobei nicht nur eine Verankerung zwischen einem Molekül und dem Lipid entsteht, sondern ebenfalls die Proteinaktivität durch PA moduliert werden kann (Zegarlinska et al., 2018). Das negativ geladene PA-Lipid ermöglicht direkte Interaktionen mit positiv geladenen Argininen und Lysinen (Young et al., 2010; Zegarlinska et al., 2018). Bedingt durch die Länge der Arginin-Seitengruppe (bis zu 0,1 Å), ist diese Bindung instabiler vergleichend zu einer Lysin-Interaktion und entspricht einer schwächeren Interaktion (Kooijman et al., 2007). Für bestehende Interaktionen wirken Tryptophan und Histidin als stabilisierende Faktoren (Ogawa et al., 2015).

CL gehört zu der Gruppe der Disphosphatidylglycerine und besteht aus einem 1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol mit zwei veresterten Phosphatgruppen an der C1- und C3-Position und der Verbindung zu vier Fettsäuren. Der Name basiert auf der erstmaligen Isolation aus einem Herzen (griechisch *kardia* – das Herz) (Pangborn, 1945, 1946a, b).

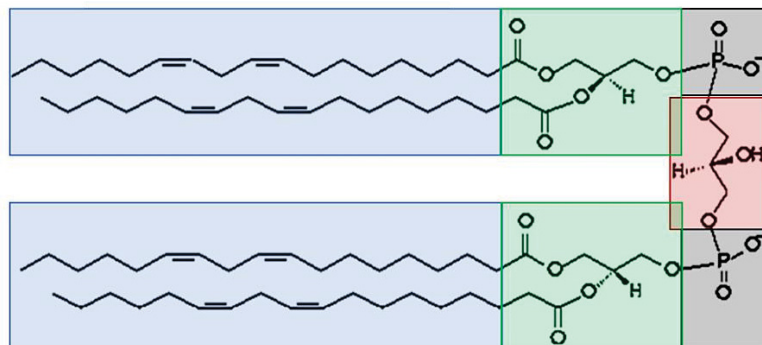


Abbildung 42: Die Struktur von CL. CL besteht aus einem Glycerin (Rot), welches an der C1- und C3-Position mit Phosphatgruppen verestert ist (Schwarz). Diese Phosphatgruppen binden an Glycerophosphatide (Grün) und die wiederum an vier ungesättigte Fettsäuren (Blau) (modifiziert nach: The LipidWeb).

CL ist prädominant in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Dort stellt es 20 % aller vorhandenen Lipide dar. In der äußeren mitochondrialen Membran sind bis zu 3 % vertreten (de Kroon et al., 1997; Gebert et al., 2009; Pangborn, 1945; Tatsuta und Langer, 2017). Peroxisome beinhalten in ihrer Membran ebenfalls 2–4 % CL (Wriessnegger et al., 2009). Das CL-Lipid übernimmt eine wichtige Funktion beim mitochondrialen Proteintransport (Eilers et al., 1988; Jiang et al., 2000; van der Laan et al., 2007). Es ist ebenfalls bekannt, dass CL besonders häufig in stark gekrümmten Membranregionen segregiert wird (Huang et al., 2006b). Unter Stressbedingungen werden von der inneren mitochondrialen Membran die CL-Lipide in die äußere mitochondriale Membran transportiert, sodass die CL-Menge in der äußeren Membran signifikant zunimmt (Lacombe et al., 2009; Luevano-Martinez et al., 2015). Bei serologischen Untersuchungen von Autoimmun-erkrankten, *T. gondii*-infizierten Patienten, konnte eine Korrelation von körpereigenen Antikörpern gegen CL und anti-Toxoplasmen Antikörper (IgG) identifiziert werden (Shapira et al., 2012). Es ist außerdem bekannt, dass die Veränderung des CL-Haushaltes in den Membranen die Funktion von Mitochondrien beeinflusst, was mit einigen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht wird (He und Han, 2014; Mulligan et al., 2014; Paradies et al., 2004; Petrosillo et al., 2005; Sparagna et al., 2007). Des Weiteren ist CL an dem mitochondrialen Netzwerk mit spezifischen Fusions- und Spaltungsmechanismen beteiligt (Kameoka et al., 2018). Dabei wirkt es als Aktivator für spezifische Dynamamin-ähnliche GTPasen und fördert deren Oligomerisation (Bustillo-Zabalbeitia et al., 2014; DeVay et al., 2009; Meglei und McQuibban, 2009; Scorrano, 2008; Shirihai et al., 2015). Es wird spekuliert, ob CL-reiche Membranen als Bindestellen für bestimmte Proteinkomplexe dienen könnten. Bedingt durch die zweifach negative Ladung können besonders gut positiv geladene Arginine und Lysine gebunden werden, was eine spezifische Rekrutierung von Proteinen befürworten würde.

In den analysierten *Membran Lipid Strips* war die Interaktion der GFP-gekoppelten Fusionsproteine nicht signifikant erhöht für Phosphatidylserin (PS). Dieses Glycerophospholipid ähnelt strukturell PA, mit Ausnahme einer zusätzlichen Serin-Gruppe mit einer zwitterionischen Ladung. PS wurde für nachfolgende Untersuchungen als Kontrolllipid verwendet.

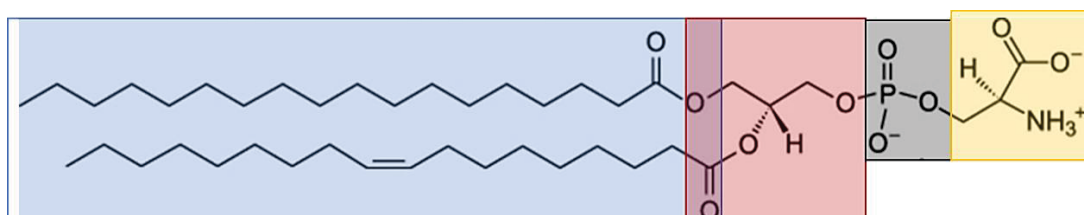


Abbildung 43: Die Struktur von PS. Dieses Lipid besteht aus einem Glycerin (Rot), welches an der C1- und C2-Position über Esterbindungen mit einer gesättigten und einer ungesättigten Fettsäure verbunden ist (Blau). Über die C3-Position ist eine Phosphatgruppe verestert (Schwarz), an der eine zwitterionische Serin-Gruppe gebunden ist (Gelb) (modifiziert nach: Avanti Polar Lipids – PS).

Trotz des gemeinsamen CDP-DAG *de novo* Synthesewegs aller fokussierten Lipide (Carter und Kennedy, 1966; Shen et al., 1996; Carman und Han, 2011), ist nur für PA und CL aber nicht für PS eine signifikant erhöhte Protein-Lipid-Interaktion detektierbar. Als Grund für die Abwesenheit einer Lipid-Affinität von GFP-mGBP2 und GFP-mGBP7 zu PS lässt sich die zwitterionische Ladung dieses Lipids im Vergleich zu der negativen Ladung von CL und PA, benennen. Die Ergebnisse dieser

Forschungsarbeit deuten darauf hin, dass eine negative Lipid-Ladung für eine potenzielle Lipid-Affinität für die untersuchten mGBPs notwendig ist. Die Ergebnisse der *Membran Lipid Strips* wurden darauffolgend für weiterführende Experimente verwendet. Zum einen sollten die potenziellen Lipid-Affinitäten bestätigt oder widerlegt werden, zum anderen sollte der Akkumulation-Mechanismus der mGBPs auf eine direkte Interaktion hin analysiert werden. In dieser Forschungsarbeit wurden anhand der vorausgehenden Ergebnisse künstliche Membranen durch die elektroformative GUV-Technologie (*Giant Unilamellar Vesicles*) hergestellt (Abschnitt 4.2, Abbildung 29). Mit Hilfe dieser TexasRed-markierten GUV-Membranen konnten direkte Interaktionen der GFP-gekoppelten Proteine konfokal-mikroskopisch visualisiert werden. Es wurden sowohl für PA-GUVs als auch für CL-GUVs direkte Interaktionen mit GFP-mGBP2 und GFP-mGBP7 nachgewiesen, allerdings nicht für PS-GUVs. Bei einer Zählung aller positiv-beladenen GUVs auf einer Fläche von 20 mm² wurden der Einfluss einer GTP-Zugabe und die quantitative mGBP-positive GUV-Anzahl zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt (Abbildung 29b)). Es war offensichtlich, dass eine GTP-Zugabe und folglich die GTPase-Aktivität der Proteine innerhalb dieses Interaktionsmodells keinen Einfluss ausübte. Des Weiteren war ein Anstieg der Protein-Lipid-Interaktionen für die Fusionsproteine mGBP2 und mGBP7 insbesondere für CL, aber auch für PA, über die Zeit nachweisbar. mGBP7- und mGBP2-positive PS-GUVs waren kaum detektierbar, ebenso konnte keine Interaktionsfähigkeit des freien GFP-Proteins zu den untersuchten Lipiden beobachtet werden. Die nachfolgenden Auswertungen der GFP-Fluoreszenz-Intensität an den verschiedenen Lipid-Membranen zeigte signifikante Ergebnisse für beide Fusionsproteine an PA und CL, aber nicht an PS (Abschnitt 4.2, Abbildung 29c). Folglich konnte optisch, quantitativ und qualitativ die direkte Lipid-Interaktion trotz struktureller Unterschiede (Vorhandensein einer mGBP2-CaaX-Box) von GFP-mGBP2 und GFP-mGBP7 an den Lipiden PA und CL nachgewiesen werden.

Gründe für diese spezifischen Lipid-Interaktionen könnten die Aminosäuren-Zusammensetzungen von mGBP2 und mGBP7 sein. Die mGBP2-assoziierte CaaX-Box (Isoprenylierungsmotiv), welche eine Konsensus-Sequenz aus Cystein (C), zwei aliphatischen Aminosäuren (aa) und einer beliebigen Aminosäure (X) aufweist, wird durch Protein-Prenyltransferasen posttranslational isoprenyliert. Nach der proteolytischen Abspaltung der C-terminalen aaX-Aminosäuren werden Isopren-Derivate der Farnesyl- oder Geranylgeranylreste über eine Thioetherbindung an die Cystein-Reste gebunden (Casey und Seabra, 1996). In Degrandi et al., 2013, konnte bereits beschrieben werden, dass die C-terminale mGBP2-Domäne, inklusive der CaaX-Box, essenziell für die Rekrutierung zur *T. gondii*-PV ist und eine Mutation der CaaX-Box dazu führt, dass mGBP2 nicht mehr an die PV rekrutiert (Degrandi et al., 2013). Entsprechend besteht die naheliegende Vermutung, dass die Isoprenylierung die Basis für die direkte mGBP2-Lipid-Interaktion darstellt. Der Interaktions-Mechanismus für mGBP7 ist demnach ein anderer als für mGBP2. Bedingt durch bioinformatische Simulationen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Birgit Strodel (Legewie et al., 2019), wurde als mögliche Basis für die Lipid-Interaktionen die C-terminalen 49 Aminosäuren ermittelt. Die Sequenz der mGBP7-Aminosäuren, mit dem Fokus auf die C-terminalen 49 Aminosäuren, ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 46).

a) mGBP7

10	20	30	40	50
MASGPNMEAP	VCLVENENEE	LRVNSKAINI	LERITQPVVV	VAIVGLYRTG
60	70	80	90	100
KSYLMNRLAG	QNHGFNLGTT	VRSETKGIWM	WCVPHPSKPK	FTLVLLDTEG
110	120	130	140	150
LGDVEKGDPK	NDSWIFALAV	LLSSTFVYNS	MSTINHQAEL	QLHYVTELTE
160	170	180	190	200
RIRAKSTSR	EEVDDSDDEF	SFFPDFIWTV	RDFVLELKLE	GRVITADEYL
210	220	230	240	250
ENALKLIPGM	SIKAQKANLF	RECIRHFFPR	RKCFVDRPT	KDKELLVHVE
260	270	280	290	300
EMPEQLDHS	FQVQSKEFCS	YIFSNSKAKT	LKEGIVVNGN	RLATLVITYV
310	320	330	340	350
DAINSGDVPC	LENAVTTLAQ	RENSIAVQKA	ADHYSEQMAQ	RMRLPTDTLQ
360	370	380	390	400
ELLTVHTACE	KEAIAVMEH	SFKDENQQFQ	KNLVVTIEEK	KEDFLRQNEA
410	420	430	440	450
ASLSHCQAE	DKLSESLRES	ISRGVFSVPG	GHRLYLEARK	KVEQDYERP
460	470	480	490	500
RKGVKANHVL	QSFLQSQISI	EDSIMQSDKA	LTDGQKAMEA	ERAQKEAAEK
510	520	530	540	550
EQELLRQKQK	ELQQVMEAQE	RSYKENVAQL	HEKMETERKN	ILREQEVKLE
560	570	580	590	600
HKLKIQKML	NEGFRRKEA	MDLEISQLQK	EIQLNKEKNS	SLGAKILDGF
610	620	630		
GDVLISVVP	SGKYFGLGLK	ILSSQMNQTQ	NSDKVRKL	

b)

Serin
Serin-Leucin-Glycin-Alanin-Lysin-Isoleucin-Leucin-Asparaginsäure-Glycin-Penylalanin
Glycin-Asparaginsäure-Valin-Leucin-Isoleucin-Serin-Valin-Valin-Prolin-Glycin
Serin-Glycin-Lysin-Tyrosin-Phenylalanin-Glycin-Leucin-Glycin-Leucin-Lysin
Isoleucin-Leucin-Serin-Serin-Glutamin-Methionin-Asparagin-Glutamin-Threonin-Glutamin
Asparagin-Serin-Asparaginsäure-Lysin-Valin-Arginin-Lysin-Leucin

Abbildung 44: Die Aminosäuren-Zusammensetzung von mGBP7. a) die vollständige Aminosäuresequenz von mGBP7, wovon die C-terminalen 49 Aminosäuren gelb markiert sind. b) Fokus auf die C-terminalen 49 Aminosäuren, wovon positiv geladene Aminosäuren wie Lysin und Arginin in Rot hervorgehoben werden und aliphatische, hydrophobe Aminosäuren in Blau dargestellt sind (mGBP7 Aminosäuren-Zusammensetzung, UniProt, Access No.: Q91Z40-1).

Es ist bereits bekannt, dass negativ geladenen PA- und CL-Lipide mit positiv geladenen Arginin- und Lysin-Resten interagieren können (Kooijman et al., 2007; Rytomaa und Kinnunen, 1995; Young et al., 2010; Zegarliniska et al., 2018). Die dargestellten C-terminalen 49 Aminosäuren von mGBP7 zeichnen sich neben einer Vielzahl aliphatischer Aminosäuren (Blau) mit fünf positiv geladenen Lysinen und einem positiv geladenen Arginin aus (Abbildung 44). Entsprechend ist davon auszugehen, dass diese Aminosäuren zu direkten elektrostatischen Interaktionen mit PA und CL führen. Für CL konnte außerdem beschrieben werden, dass hydrophobe Interaktionen mit Leucin, Isoleucin und Valin aufgebaut werden können (Kalanxhi und Wallace, 2007). Die hohe Anzahl hydrophober, unpolarer Leucine, Isoleucine und Valine sind entsprechend nicht nur für die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur wichtig, sondern könnten auch die hydrophoben mGBP7-Lipid-Bindungen fördern.

In nachfolgenden Experimenten wurden die Akkumulations-Muster der mGBP2- und mGBP7-Fusionsproteine anhand von jeweils drei Beispielen an PA- und CL-GUVs analysiert. Diese schienen sich voneinander zu unterscheiden (Abschnitt 4.2, Abbildung 30). GFP-mGBP2 zeigte für beide untersuchten Lipide eine konstante Akkumulation, mit meist einer auffälligen Ansammlung an mGBP2-Proteinen an einer Position der GUV-Membran. Ein ähnliches Muster wurde auch für GFP-mGBP7 an PA-GUVs detektiert. Die mGBP7-Akkumulation an CL entsprach einer ungleichmäßigen Verteilung der Fusionsproteine entlang der CL-GUV-Oberfläche. Diese unterschiedliche Akkumulation der mGBPs an CL- und PA-Lipiden, könnte aufgrund einer unregelmäßigen Verteilung der CL-Lipide innerhalb der GUV-Membran entstanden sein. Im Fall der PA-Akkumulation könnte auch eine Deprotonierung der PA-Lipide durch die Bindung positiver Aminosäuren und umliegender Phosphatidylcholin-Lipide (PC) (Bestandteil der GUVs zu 74,75 mol %) der Grund sein. Dies führt zu einer Ausbildung hochreaktiver Anionen, welche besonders gut von positiv geladenen Aminosäuren gebunden werden können (Zegarliniska et al., 2018). Die mGBP7 C-terminalen positiv geladenen Arginine und Lysine könnten entsprechend besonders stark an die

hochreaktiven, negativ geladenen PA-Lipide interagieren. Die benachbarten PC-Lipide würden den Zustand der deprotonierten, hochreaktiven PA-Lipide unterstützen und eine Interaktion fördern. Dies könnte eine Erklärung für die Verteilung der mGBPs an den PA-GUVs erklären, obwohl der eigentliche PA-Gehalt innerhalb der GUVs „nur 5 mol %“ entspricht.

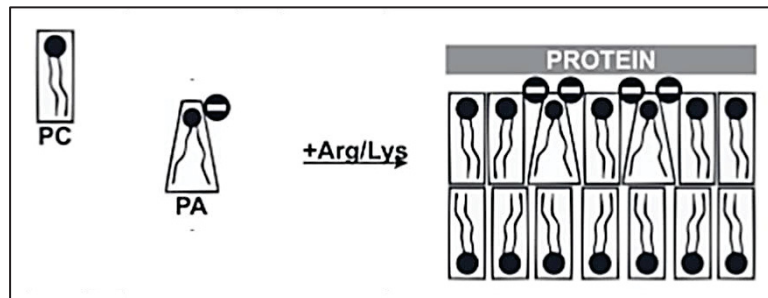


Abbildung 45: Deprotonierung von PA innerhalb einer Membran mit PC durch Arginin- oder Lysin-Interaktionen. Proteine mit Arginin- oder Lysin-Resten binden an PA durch Bindungsmechanismen, wodurch die negative Bindung von PA verstärkt wird. Dadurch wird das deprotonierte PA zu einem hochreaktiven Anion (Modifiziert nach Zegarinska et al., 2018).

Besonders für die PA-Akkumulation waren sowohl für GFP-mGBP2 als auch für GFP-mGBP7 eine Ansammlung der Proteine an einer Position der GUV-Membran detektiert worden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Proteine bereits oligomerisiert an den hochreaktiven Anionen vorliegen können und entsprechend ein stärkeres Fluoreszenz-Signal emittieren. Die unregelmäßige Fusionsprotein-Verteilung an CL-GUVs könnte für eine direkte Akkumulation an den CL-Lipiden mit einer nachfolgenden, starken mGBP-Cluster-Bildung durch oligomerisierte Fusionsproteine sprechen. Das PC ist wie PS zwitterionisch geladen und konnte bei den *Membrane Lipid Strips* nicht mit mGBP2 oder mGBP7 interagieren. Um die genaue Rolle des PC in den untersuchten GUVs bestimmen zu können, müssten spezifische Interaktionsanalysen mit den GFP-Fusionsproteinen und reinen PC-GUVs durchgeführt werden. Entsprechend dieser Ergebnisse könnten detailliertere Aussagen getroffen werden.

Ein weiteres Experiment umfasste die Analyse der mGBP-Rekrutierung und -Beeinflussung innerhalb dieses Interaktionsmodells. Diese Untersuchungen basierten auf den vorherigen *in vitro* Ergebnissen von mGBP2 mit mGBP7, bei denen eine Beeinflussung von mGBP2 auf die Rekrutierung von mGBP7 nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 4.1.2, Abbildung 14 und Abbildung 15). Diesbezüglich wurden mCherry-fusioniertes mGBP2 und mGBP7 aus Zelllysaten mittels spezifischer RFP-Beads isoliert, aufgereinigt und auf ihre Aktivität untersucht. Beide Fusionsproteine zeigten signifikante GTPase-Aktivitäten im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen (Abschnitt 4.2, Abbildung 31). Die funktionellen Fusionsproteine wurden gemeinsam mit den GFP-gekoppelten Proteinen in spezifischer Zusammensetzung (GFP-mGBP2 + mCh-mGBP7/mCh-mGBP2 + GFP-mGBP7) für weitere GUV-Experimente verwendet. In diesem Fall wurden die PA- und CL-GUVs nicht mit TexasRed markiert, sodass eine genaue Interaktion beider Fusionsproteine mit den GUVs mittels Konfokalmikroskopie detektiert werden konnte (Abschnitt 4.2, Abbildung 32). Die mikroskopischen Analysen und die qualitative Auswertung zeigten, dass keine direkte Beeinflussung bezüglich der Akkumulation der Fusionsproteine innerhalb dieser Interaktionsanalyse bestand. Eine Erklärung für die nicht vorhandene, und *in vitro* in infizierten Zellen bereits detektierte, Rekrutierungsordnung zwischen den Fusionsproteinen könnte das angewandte, isolierte GUV-Interaktionsmodell sein, bei

dem interagierende Effektorproteine, zellregulatorische Abläufe oder Interaktionsfaktoren nicht berücksichtigt wurden.

Zusammenfassend konnten sowohl für GFP-mGBP2 als auch für GFP-mGBP7 direkte elektrostatische Interaktionen mit den Lipiden PA und CL nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bereits publizierter Arbeiten, sowie die Daten aus dieser Forschungsarbeit, deuten auf eine Interaktion für mGBP2 durch die Isoprenylierung des Cysteins innerhalb des CaaX-Motivs. Die mGBP7-Fusionsproteine interagierten vermutlich durch positiv geladene Aminosäuren im C-Terminus der Proteinstruktur. Erste Versuche deuten dabei insbesondere auf die C-terminalen 49 Aminosäuren. Zudem ist zu spekulieren, dass hydrophobe Wechselwirkungen zu CL durch eine Vielzahl aliphatischer Aminosäuren aufgebaut wurden. Das zwitterionische PS wurde wohl aufgrund seiner positiven Ladung nicht gebunden.

5.3. Untersuchungen der mGBP7-Bindungsstellen für eine Lipid-Interaktion

Anhand der vorherigen Auswertungen und der Fokussierung auf die C-terminalen Aminosäuren des mGBP7-Proteins ist zu vermuten, dass diese C-terminale Aminosäuren entscheidend für eine direkte Protein-Lipid-Interaktion sind. Um diese These zu bestätigen, wurden vier Trunktationsmutanten des mGBP7-Proteins hergestellt und analysiert (Abschnitt 4.3, Abbildung 33). Die mGBP7^G-Mutante bestand nur aus der mGBP-spezifischen GTPase Domäne. Eine zweite Trunktationsmutante enthielt die mittlere, stabilisierende M Domäne und die C-terminale GTPase Effektor-domäne (mGBP7^{ME}). In Hinblick auf die vorausgegangenen Ergebnisse, wurde eine mGBP7^{Δ49}-Mutante mit einer Deletion der C-terminalen 49 Aminosäuren hergestellt. Außerdem wurde eine weitere Mutante mit einer Punktmutation an der 51. Aminosäuren-Position von einem Lysin (K) zu einem Alanin (A) im mGBP7-Protein angefertigt (mGBP7^{K51A}), womit die GTP-Hydrolyse nicht mehr möglich ist (Abschnitt 4.3, Abbildung 33a)). Diese mutierten Proteine wurden N-terminal mit GFP fusioniert und lentiviral in mGBP7-defiziente Zelllinien transduziert. Mit Hilfe der zuvor beschriebenen GFP-Beads konnten die Fusionsproteine isoliert und aufgereinigt werden. Die Untersuchung der GTPase Aktivität zeigte hohe Aktivitäten für das mGBP7-Fusionsprotein sowie für GFP-mGBP7^G und GFP-mGBP7^{Δ49}. Die mGBP7^{ME}- und mGBP7^{K51A}-Mutanten verfügten über keine nachweisbare GTPase-Aktivität (Abschnitt 4.3, Abbildung 33c)). Diese Ergebnisse belegten die Funktion der GTPase Domäne (*G Domain*) für die GTPase Aktivität. Bei Proteinen ohne G Domäne, oder mit einer mutierten G1-Sequenz innerhalb dieser Domäne, ist eine Nukleotidbindung mit nachfolgender Hydrolyse nicht mehr möglich (Legewie et al., 2019). Der Verlust der Hydrolyse-Fähigkeit der K51A-Mutante konnte bereits zuvor für das mGBP2-Protein nachgewiesen werden (Kravets et al., 2012).

In dieser Forschungsarbeit wurde zuvor gezeigt, dass GFP-mGBP2 und GFP-mGBP7 mit PA und CL auf *Membrane Lipid Strips* sowie mit künstlich synthetisierten PA- und CL-GUVs interagieren konnten, unabhängig von einer GTP-Zugabe (Abschnitt 4.2). Entsprechend wurden trotz teilweiser fehlender GTP-Hydrolysefähigkeit, alle GFP-gekoppelten mGBP7-Mutanten für nachfolgende Versuche verwendet. Die *Membrane Lipid Strips* wiesen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Lipid-Affinitäten von GFP-mGBP7^{ME} und GFP-mGBP7^{K51A} im Vergleich zu GFP-mGBP7 auf. Die

mGBP7^G-Mutante konnte keine Interaktion mit einem der 15 hochkonzentrierten Lipide eingehen. Die mGBP7^{Δ49}-Fusionsproteine interagierten mit PA und CL, allerdings mit einer stark reduzierten Intensität im Vergleich zu GFP-mGBP7, GFP-mGBP7^{ME} und GFP-mGBP7^{K51A}. Diese Auswertungen zeigten bereits die Notwendigkeit der E Domäne und dabei insbesondere die C-terminalen 49 Aminosäuren innerhalb der mGBP7-Proteinstruktur. Bei einer vollständigen Deletion dieser Domäne war eine Interaktion zu Lipiden durch dieses Experiment nicht mehr nachweisbar. Eine um 49 Aminosäuren verkürzte E Domäne veranschaulichte signifikant reduzierte Bindungsaffinitäten im Vergleich zu der vollständigen Proteinstruktur (Abschnitt 4.3, Abbildung 34). Die nachfolgenden mikroskopischen *in vitro* Untersuchungen in transduzierten mGBP7-Mutationszelllinien verdeutlichten die Protein-Akkumulation an der *T. gondii*-PV (Abschnitt 4.3, Abbildung 35). Durch die Auswertung der quantitativen Akkumulationsfrequenz der mGBP7-Mutationsproteine an der *T. gondii*-PVM wurde ersichtlich, dass GFP-mGBP7^{ME} und die K51A-Mutante keinen signifikanten Unterschied zu GFP-mGBP7 mit einer Akkumulationsfrequenz von über 40 % nach einer zwei-stündigen *T. gondii*-Infektion aufwiesen. Für die alleinige G Domäne war keine *T. gondii*-Akkumulation detektierbar. Und auch die mGBP7^{Δ49}-Fusionsproteine zeigten nur eine sehr stark reduzierte Akkumulation an *T. gondii*. Diese Auswertung verdeutlichte zwei wichtige Ergebnisse: Zum einen ist die mGBP7-Akkumulation an die *T. gondii*-PVM nicht abhängig von ihrer GTPase-Aktivität. Sowohl mGBP7^{ME} als auch mGBP7^{K51A}, die beide keine GTPase-Aktivität aufwiesen, zeigten signifikante Akkumulationsfrequenzen. Dieser Effekt unterscheidet sich zu den bereits bekannten Ergebnissen von mGBP2, welches die GTPase-Aktivität für eine PV-Akkumulation benötigt (Kravets et al., 2012). Im Fall von mGBP7 ist zu vermuten, dass die GTP-Hydrolyse kein essenzieller Faktor für die Akkumulation an die Parasiten-PV einnimmt und vielmehr einen Effekt auf die Oligomerisierung und Assemblierung in VLS ausübt. Diese Vermutung wird gestützt durch das Fehlen einer mGBP7-Lokalisation in VLS bei allen mGBP7-Mutanten in uninfizierten Zellen (Abschnitt 4.3, Abbildung 35b)).

Des Weiteren konnten die *in vitro* Untersuchungen die Bedeutung der C-terminalen 49 Aminosäuren von mGBP7 verdeutlichen. Bei einer Deletion dieser Aminosäuren wurde eine stark reduzierte Akkumulation an *T. gondii* beobachtet. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen der Aminosäuren zu den *T. gondii*-Membranen als auch die daraus resultierende Stabilität und Flexibilität des Proteins, entscheidend für eine effektive Akkumulation an der PVM sind. Nachfolgend wurden erneut direkte Interaktionsanalysen an PA- und CL-GUVs mit den GFP-fusionierten Mutantenproteinen durchgeführt (Abschnitt 4.3, Abbildung 36). Die künstlich synthetisierten Membranen wurden unter den zuvor beschriebenen Bedingungen hergestellt. Im isolierten Interaktionssystem konnten direkte Lipid-Bindungen von mGBP7^{ME}- und mGBP7^{K51A}-Fusionsproteinen nachgewiesen werden. Für GFP-mGBP7^{Δ49} waren nur sehr schwache, bis gar keine Effekte nachweisbar und für GFP-mGBP7^G konnten keine Interaktionen detektiert werden. Zusammenfassend ergeben die Ergebnisse, dass ein mutiertes mGBP7-Protein atypische Lokalisations- und Bindefähigkeiten aufwies und charakteristische Eigenschaften wie beispielsweise die GTPase-Aktivität, verlor. Die Notwendigkeit der G Domäne und besonders des G1-Sequenzbereiches konnte für die GTPase-Aktivität des Proteins bestätigt werden (und auch

Legewie et al., 2019). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die GTPase-Aktivität von mGBP7 für eine Protein-Akkumulation an der *T. gondii*-PVM keine Voraussetzung darstellte. Die E Domäne und insbesondere die C-terminalen 49 Aminosäuren sind als Schlüsselabschnitt für die mGBP7-Membraninteraktion identifiziert worden.

Auf Grund der vorherigen Ergebnisse wurden zwei weitere Deletionsmutanten für die detaillierte Analyse der C-terminalen 49 Aminosäuren hergestellt (Abschnitt 4.3, Abbildung 37). Bei den GFP-mGBP7^{Δ20}- und GFP-mGBP7^{Δ30}-Fusionsproteinen wurden die C-terminalen 20, beziehungsweise 30 Aminosäuren deletiert, um die Lipid-Interaktionen und Bindestellen detaillierter zu charakterisieren. Wie zuvor beschrieben wurden die Fusionsproteine mit GFP-Beads isoliert, aufgereinigt und für *Membran Lipid Strips* verwendet (Abschnitt 4.3, Abbildung 38). Die Quantifizierung dieser Ergebnisse veranschaulichte keine signifikanten Unterschiede der Δ20- und Δ30-Deletionsmutanten bezüglich der PA-Interaktion im Vergleich zu GFP-mGBP7, die Lipid-Affinität von mGBP7^{Δ49} war signifikant reduziert. Die Lipid-Affinität zu CL war bereits bei einer Deletion von 20 Aminosäuren signifikant verschieden zu GFP-mGBP7. Des Weiteren konnten erhöhte Lipid-Affinitäten der Δ20- und Δ30-Fusionsproteine für PtdIns(4,5)P₂ detektiert werden, die so für GFP-mGBP7 als auch für die GFP-mGBP7^{Δ49}-Mutante nicht ermittelt werden konnten.

a) **mGBP7**

Glutaminsäure-Isoleucin-Glutamin-Leucin-Asparagin-Lysin-Glutaminsäure-Lysin-Asparagin
 Serin
 Serin-Leucin-Glycin-Alanin-Lysin-Isoleucin-Leucin-Asparaginsäure-Glycin-Penylalanin
 Glycin-Asparaginsäure-Valin-Leucin-Isoleucin-Serin-Valin-Valin-Prolin-Glycin
 Serin-Glycin-Lysin-Tyrosin-Phenylalanin-Glycin-Leucin-Glycin-Leucin-Lysin
 Isoleucin-Leucin-Serin-Serin-Glutamin-Methionin-Asparagin-Glutamin-Threonin-Glutamin
 Asparagin-Serin-Asparaginsäure-Lysin-Valin-Arginin-Lysin-Leucin

b) **mGBP7^{Δ20}**

Glutaminsäure-Isoleucin-Glutamin-Leucin-Asparagin-Lysin-Glutaminsäure-Lysin-Asparagin
 Serin
 Serin-Leucin-Glycin-Alanin-Lysin-Isoleucin-Leucin-Asparaginsäure-Glycin-Penylalanin
 Glycin-Asparaginsäure-Valin-Leucin-Isoleucin-Serin-Valin-Valin-Prolin-Glycin
 Serin-Glycin-Lysin-Tyrosin-Phenylalanin-Glycin-Leucin-Glycin

c) **mGBP7^{Δ30}**

Glutaminsäure-Isoleucin-Glutamin-Leucin-Asparagin-Lysin-Glutaminsäure-Lysin-Asparagin
 Serin
 Serin-Leucin-Glycin-Alanin-Lysin-Isoleucin-Leucin-Asparaginsäure-Glycin-Penylalanin
 Glycin-Asparaginsäure-Valin-Leucin-Isoleucin-Serin-Valin-Valin

d) **mGBP7^{Δ49}**

Glutaminsäure-Isoleucin-Glutamin-Leucin-Asparagin-Lysin-Glutaminsäure-Lysin-Asparagin

Abbildung 46: Darstellung der C-terminalen Aminosäuren von mGBP7 (a) und den Trunkationsmutanten Δ20 (b), Δ30 (c) und Δ49 (d). In Grau sind die neun E Domäne-Aminosäuren vor den C-terminalen 49-Aminosäuren dargestellt. In Rot werden die positiv geladenen Aminosäuren hervorgehoben, in Blau die aliphatischen Aminosäuren (mGBP7 Aminosäuren-Zusammensetzung, UniProt, Access No.: Q91Z40-1).

Die Aminosäuresequenzen aus Abbildung 48 verdeutlichen, dass womöglich die Interaktion eines Lysins zum PA-Lipid im Fall von GFP-mGBP7^{Δ30} ausreichend für den Aufbau einer stabilen Interaktion bei den *Membran Lipid Strips* war. Die aliphatischen Aminosäuren waren weiterhin in der Lage,

hydrophobe Wechselwirkungen des Proteins zu ermöglichen und eine strukturelle Stabilität aufrecht zu erhalten. Gegenteilig waren die Auswirkungen der verschiedenen C-terminalen Deletionen für die CL-Interaktion. Das Vorhandensein von einem oder zwei Lysinen war für eine stabile Interaktion nicht ausreichend. Ebenso die Deletion einiger aliphatischer Aminosäuren und damit eine Reduktion der hydrophoben Interaktionen vom Protein mit dem Lipid, verursachte eine Auflösung der Bindungseigenschaften.

Die Interaktion zum PtdIns(4,5)P₂ verdeutlichte einen signifikant erhöhten Affinitätseffekt für GFP-mGBP7^{Δ20} und GFP-mGBP7^{Δ30}, der so zuvor nicht dokumentiert werden konnte. Das PtdIns(4,5)P₂ ist ein essentielles Membran-Signalmolekül und für die Regulation der Endo- und Exozytose, für die Aktinzytoskelett-Dynamik, für den Ionentransport und für Adhäsions- und Assemblierungseffekte verantwortlich und hauptsächlich in Plasmamembranen vorzufinden (Huang, 2007; Schramp et al., 2012). Es ist bereits bekannt, dass für eine PtdIns(4,5)P₂-Interaktion mindestens zwei Aminosäuren notwendig sind, wovon eine Lysin und die andere eine Aminosäure mit einem aromatischen Rest sein muss (Hansen, 2015; Logothetis et al., 2015; Suh und Hille, 2008). Zudem ist eine bevorzugte Interaktion innerhalb einer Tasche aus aromatischen Aminosäuren in der gefalteten Proteinstruktur beschrieben (Jian et al., 2015). Es kann spekuliert werden, ob durch die C-terminale Deletion von 20 oder 30 Aminosäuren eine entsprechende Konformationsänderung des mGBP7-Proteins hervorgerufen wird. Dieser Effekt sollte in nachfolgenden Studien detaillierter analysiert werden, da ein Lysin und ein aromatisches Tyrosin direkt nebeneinander liegen und das Vorhandensein einer weiteren aromatischen Aminosäure, dem Phenylalanin, ebenfalls beeinflussend wirken könnte. Im Falle einer tatsächlichen Konformationsänderung durch eine Deletion von 20 oder 30 Aminosäuren in der mGBP7-Proteinstruktur, könnte dies eventuell artifiziell zu einer derartigen Taschenbildung mit einem Lysin und einer aromatischen Aminosäure für die Interaktion an PtdIns(4,5)P₂ führen.

Bei den nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen konnte für GFP-mGBP7^{Δ20} eine Frequenz von 24,67 % bezüglich einer effektiven *T. gondii*-Akkumulation, nach einer zwei-stündigen Infektionszeit festgestellt werden. Diese Frequenz war im Vergleich zu GFP-mGBP7 (44,42 %) etwa um die Hälfte reduziert. Eine Deletion von weiteren 10 Aminosäuren führte zu einer Reduktion der *T. gondii*-Akkumulation auf 12,42 %. Für GFP-mGBP7^{Δ49} war ein vollständiger Akkumulations-Verlust an den *T. gondii*-PVMs nachweisbar (1,65 %) (Abschnitt 4.3, Abbildung 39 und Abbildung 40). Es ist zu vermuten, dass die Akkumulation der mGBP7-Fusionsproteine an *T. gondii*-PVMs auf spezifischen Aminosäuresequenzen im C-terminalen Proteinabschnitt basiert. Für die PA-Interaktion war das Vorhandensein von mindestens einem positiv geladenen Lysin ausreichend, war für eine stabile Interaktion mit deprotonierten, hochreaktiven PA-Anionen sprechen würde. Für die Interaktion mit CL war mehr als nur eine positiv geladene Aminosäure notwendig. Eine Deletion der letzten fünf C-terminalen Aminosäuren (Lysin-Valin-Arginin-Lysin-Leucin) führte zum Verlust von fünf wichtigen, CL-interagierenden Aminosäuren, die durch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen stabile Interaktionen mit dem CL-Lipid aufbauen können. Eine Deletion dieser fünf Aminosäuren sollte zukünftig in Bezug auf die CL-Interaktion analysiert werden, um dieser Hypothese weiter

nachgehen zu können. Ein Verlust dieser Aminosäuren könnte insofern gedeutet werden, dass die Verbindung weiterer aliphatischer und positiv geladener Aminosäuren an CL zu instabil war.

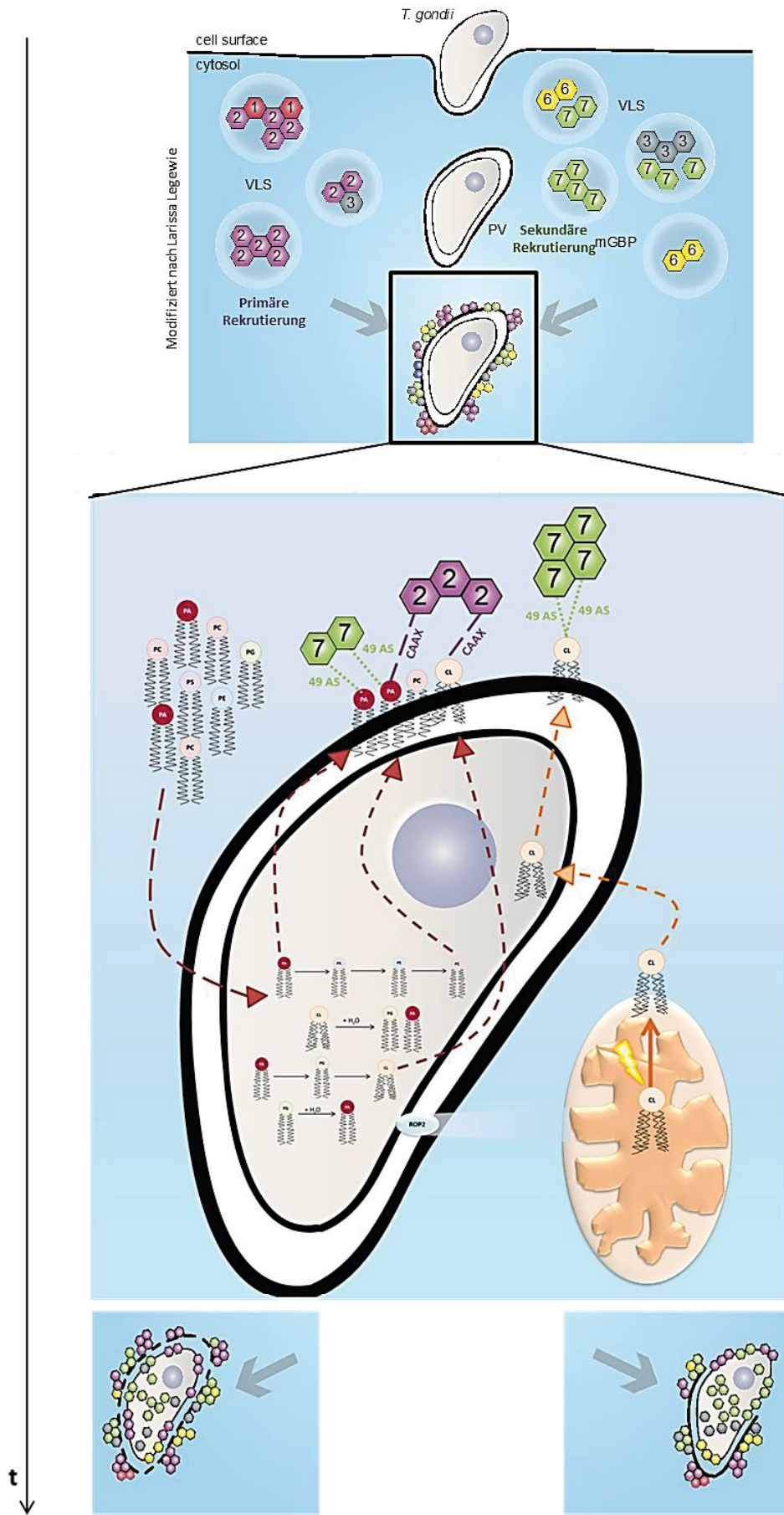
Der Nachweis einer direkten Interaktion von GFP-mGBP7 durch die C-terminalen 49 Aminosäuren an PA und CL, sowie die Abhängigkeit der mGBP-Akkumulation an der *T. gondii*-PVM durch die Anzahl und Zusammensetzung der C-terminalen Aminosäuren, führt zu der Hypothese das sowohl PA als auch CL in der PV-Membran und in der Plasmamembran von *T. gondii* vorhanden sind. Dies muss jedoch in weiteren Versuchen experimentell aufgeklärt werden. Die detaillierte Zusammensetzung der PV-Membran von *T. gondii* ist weitgehend unklar. Dennoch gibt es Hinweise, die auf das Vorhandensein von PA und CL in dieser Membran hinweisen könnten:

Abgesehen von der bereits bekannten *T. gondii*-Eigenschaft, Glycerophospholipide der Wirtszelle für die eigene Phospholipid-Synthese und für den Aufbau der PV-Membran zu verwenden (Charron und Sibley, 2002), konnte bereits ein hoher Anteil an PA innerhalb der PV nachgewiesen werden (Wang et al., 2009). Das dieses Lipid eine direkte Interaktionsmöglichkeit für mGBP2- und mGBP7-Proteine darstellt, war bislang nicht bekannt. Ein Vorhandensein der CL-Lipide in der *T. gondii*-PV ist bislang nicht bestätigt. Die *de novo* CL-Synthese in *T. gondii* ist nur bedingt untersucht worden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* mit den Mitochondrien des Wirtes eng interagiert. Diese werden durch regulatorische Prozesse der ROP2-Proteine (Abschnitt 1.4.2) an die PV-Membran lokalisiert und besonders von Typ I- und Typ II-Parasiten für einen Nährstoff- und Lipid-Austausch verwendet (Crawford et al., 2006). Das CL-Lipid befindet sich prädominant in Mitochondrien. Es wird vermutet, dass das Wirtszell-CL mit einem maximalen Molekulargewicht von 1,6 kDa durch die semi-permeable PV-Membran transportiert werden kann von *T. gondii* verwendet wird (Fu et al., 2018). Es besteht außerdem die Vermutung, dass *T. gondii* eine *de novo* Synthese der CL-Lipide in den eigenen Mitochondrien durchführt und das dabei das Toxoplasma *Acyl Coenzyme A Binding Protein* (TgACBP2) eine entscheidende Rolle spielen soll (Fu et al., 2018). Ein weiterer Hinweis ist die Detektion von körpereigenen Antikörpern gegen CL bei Autoimmun-erkrankten Patienten während einer *T. gondii*-Infektion (Shapira et al., 2012). Des Weiteren konnte bereits eine aktivierende Funktion von CL auf GTPasen und deren Oligomerisation an Membranen nachgewiesen werden (Bustillo-Zabalbeitia et al., 2014; DeVay et al., 2009; Meglei und McQuibban, 2009; Shirihai et al., 2015), was einen Bezug zu der mGBP-Akkumulation, sowie der Multimerisation von bis zu 8 000 Protein-Monomeren an der PV-Membran, darstellen könnte (Kravets et al., 2016). Das Zusammenspiel von PA und CL ist insofern erklärbar, als dass PA die Krümmung von Membranen beeinflusst (Cambrea und Hovis, 2007) und CL hauptsächlich in stark gekrümmten Membran-Regionen segregiert wird (Huang et al., 2006a).

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass die Infektion von *T. gondii* zu einer Stresssituation innerhalb der Wirtszelle führt. Die CL-Lipide könnten entsprechend in die äußere mitochondriale Membran transportiert werden (Lacombe et al., 2009). Aufgrund der *T. gondii*-gesteuerten Assoziation mit den Wirtszell-Mitochondrien, besteht die Möglichkeit eines CL-Transports durch die PV-Membran und der weiterführenden Verwendung durch den Parasiten. Die hochreaktiven, anionischen PA-Lipide und das CL-Lipid könnten durch spezifische Interaktionsmechanismen von den mGBP-Proteinen gebunden werden. mGBP2 verdeutlicht dabei die vermutete, primäre

Immunreaktion und interagiert direkt mit den PV-Lipiden durch die C-terminale Isoprenylierungsseite. Das nachfolgende, sekundäre mGBP7 könnte mit Hilfe der C-terminalen 49 Aminosäuren durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit PA- und CL- Lipiden interagieren. Bedingt durch die vorausgegangene Destabilisierung der PV-Membran von mGBP2, wäre eine schnellere Immunreaktion gegen *T. gondii* durch mGBP7 möglich.

Die Detektion von CL und PA als interagierende Lipide für mGBP2 und mGBP7, sowie die spezifischen Bindungseigenschaften der Proteine, können zu der Entwicklung möglicher Behandlungsmethoden gegen *T. gondii* beitragen. Es wurde bereits vermutet, dass das Vorhandensein einer CL-Synthase aus bakteriellem Ursprung in diesen Parasiten als ein potenzielles Ziel für medikamentöse Behandlungen genutzt werden könnte (Ramakrishnan et al., 2013).



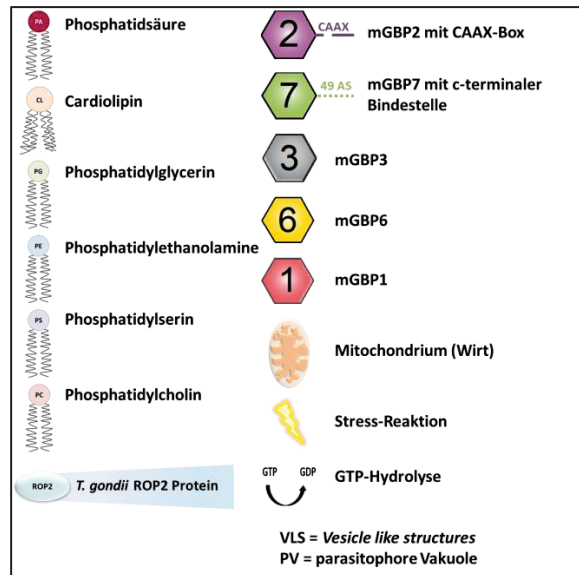


Abbildung 49: Schema der hypothetischen mGBP-Rekrutierung zur *T. gondii*-PVM. Für mGBP2 war bereits die Lokalisation in VLS mit mGBP1 und mGBP3 bekannt, allerdings konnte eine derartige Formation nicht für mGBP2 mit mGBP7 festgestellt werden. mGBP2 rekrutiert primär an die *T. gondii*-PVM. mGBP7 agiert als sekundäres Rekrutierungs-Protein an die PVM des Parasiten. Die PV-Zusammensetzung ist noch weitgehend unbekannt. Bisherige Untersuchungen zeigen CL und PA als direkte Interaktions-Lipide für mGBP2 und mGBP7. Es gibt Hinweise, dass das CL durch einen Austausch mit assoziierten Wirts-Mitochondrien aufgenommen wird (Mitochondrien werden durch ROP2 an die *T. gondii*-PV rekrutiert) und außerdem eine *de novo* Synthese für CL durch aufgenommene Phospholipide erfolgt (Crawford et al., 2006; Fu et al., 2018; Gupta et al., 2000). Es ist bereits bekannt, dass die *T. gondii*-PV reich an PA ist, welches einerseits direkt vom Wirt aufgenommen wird und andererseits neu hergestellt werden kann (Charron und Sibley, 2002; Wang et al., 2009). Diese Forschungsarbeit konnte die direkte Interaktion von mGBP7 durch die C-terminalen 49-Aminosäuren an CL und PA nachweisen. Dieser Effekt, und besonders die vermutete primäre Destabilisierung der PV-Membran von mGBP2-Proteinen, führt zu einer Ruptur beziehungsweise zum vollständigen Abbau der PV durch einen bislang unbekanntem Mechanismus. Durch die Destabilisierung der PV-Membran ist es den mGBPs möglich, diese zu penetrieren und direkt an die Plasmamembran zu akkumulieren. Eine direkte Plasmamembran-Akkumulation konnte für mGBP2, mGBP3 und mGBP6 und ebenfalls für mGBP7 nachgewiesen werden.

6. Ausblick

Die Ergebnisse und Analysen dieser Forschungsarbeit konnten viele offene Fragen bezüglich der dynamischen Rekrutierung und Akkumulation der mGBP-Proteine während einer *T. gondii*-Infektion beantworten. Auch konnten zwei potenzielle *T. gondii*-Membran-Lipide identifiziert werden, die direkt mit mGBP2 und mGBP7 interagieren. Diese direkten und aktiv-gesteuerten Interaktionen basierten auf unterschiedliche Mechanismen, wobei für mGBP2 und für mGBP7 verschiedene Funktionen eine Rolle spielen. In dieser Promotion konnten die C-terminalen 49 Aminosäuren von mGBP7 als strukturelles Element für eine Membranbindung detektiert werden. Für die mGBP2-Akkumulation besteht die Vermutung, dass vor allem das C-terminale Isoprenylierungsmotiv mit den mitführenden Proteinkonformationsänderungen zu einer direkten Membraninteraktion beiträgt. Diese Vermutung könnte in nachfolgenden Experimenten expliziter aufgeklärt werden, indem eine mGBP2-Mutante mit mutierter Isoprenylierungsseite (wurde bereits hergestellt und veröffentlicht, Degrandi et al., 2013) mit *Membrane Lipid Strips* inkubiert und nachfolgend mit GUVs analysiert wird. Diese sollte vergleichend zu GFP-mGBP2, GFP-mGBP7 und GFP-mGBP2^{K51A} (für diese Mutante war keine Akkumulation an der *T. gondii*-PV detektierbar, Kravets et al., 2012) durchgeführt werden.

Ein weiteres, nachfolgendes Experiment ist eine weiterführende, detailliertere mikroskopische Strukturanalyse von GFP-mGBP7 durch CLEM-Untersuchungen, um die Funktionalität dieser Proteine besser zu verstehen. Außerdem wäre die Untersuchung der Existenz einer Membran um die VLS der mGBPs ebenfalls durch diese Methodik umsetzbar. Diese Experimente könnten in Kooperation mit der AG Hensel aus der Universität Osnabrück durchgeführt werden.

Zudem sollte die Zusammensetzung der VLS mittels FRET-Analysen und spezifische Rekrutierungs- und Akkumulationseffekte zwischen den mGBPs weiterhin analysiert werden. Derartige Rekrutierungseffekte, mit einer offensichtlichen Beeinflussung von mCherry-mGBP2 auf die Rekrutierung und Akkumulation von GFP-mGBP7 an *T. gondii*, konnte bereits innerhalb dieser Forschungsarbeit identifiziert werden. Die Kollokalisationsanalysen zwischen mGBP7 und mGBP3 zeigten komplett unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu mGBP7 mit mGBP2. Um ein detailliertes Interaktions- und Rekrutierungsbild der mGBPs erstellen zu können, wäre eine Rekrutierungs- und Akkumulationsanalyse zwischen mGBP3 und mGBP2 sinnvoll. Des Weiteren sollten mGBP2, mGBP3 und mGBP7 in einem Kontext gemeinsam sowohl mikroskopisch als auch durch spezifische Kollokalisations- und Korrelationsstudien analysiert werden. Diesbezüglich könnte ebenfalls die Generierung einer mGBP3-defizienten Mauslinie wichtige Erkenntnisse über die Rolle von mGBP3 während einer *T. gondii*-Infektion *in vivo* liefern.

Besonders elementar wäre die weitere Untersuchung der mGBP-Lipid-Interaktionen. Dabei sollten zum einen die bereits bestehenden Ergebnisse weiter fokussiert werden, indem beispielsweise der Effekt der mGBPs auf die Membranintegrität untersucht wird. Dies könnte mittels GUVs untersucht werden, die mit Carboxyfluorescein gefüllt sind. Ein Austreten des Farbstoffs als Folge der mGBP-Bindung an die GUV-Membran wäre ein deutlicher Hinweis auf den Verlust der Membranintegrität durch mGBPs. Zum anderen sollten weitere mGBPs auf ihre spezifischen Lipidaffinitäten und Interaktionseffekte studiert werden. Für die Aufklärung der Deprotonierungs-Hypothese von PA und

PC innerhalb von GUVs, sollen reine PC-GUVs hergestellt werden und die mGBP-Akkumulation an diesen Lipiden analysiert werden. Anhand dieser Ergebnisse könnten weitere Experimente bezüglich der Lipid-Zusammensetzung der *T. gondii*-PVM erfolgen. Ein nachfolgender Schritt wäre eine spezifische Lipid-Färbung durch Lipidmarker direkt an der *T. gondii*-PVM, welche mikroskopisch identifiziert werden könnten. Des Weiteren könnte durch Zugabe fluoreszierender Lipide zum Medium nachvollzogen werden, ob *T. gondii* diese herbeigeführten, fluoreszierenden Lipide aus der Umgebung aufnimmt und für den Aufbau der schützenden PVM verwendet. Durch das Erlangen derartiger Informationen wäre es möglich, den Aufbau der *T. gondii*-PVM weiter aufzudecken.

Literaturverzeichnis

- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M.A., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1991. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 103 Pt 3, 321-329.
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., Akira, S., 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.
- Agrawal, A., Shrive, A.K., Greenhough, T.J., Volanakis, J.E., 2001. Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol* 166, 3998-4004.
- Ajioka, J.W., Fitzpatrick, J.M., Reitter, C.P., 2001. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med* 2001, 1-19.
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol* 327, 581-589.
- Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G.B., Sher, A., 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol* 1, 83-87.
- Aliberti, J., Valenzuela, J.G., Carruthers, V.B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Reis e Sousa, C., Fairlamb, A., Ribeiro, J.M., Sher, A., 2003. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* 4, 485-490.
- Anderson, P., Yip, Y.K., Vilcek, J., 1983. Human interferon-gamma is internalized and degraded by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 258, 6497-6502.
- Anderson, S.L., Carton, J.M., Lou, J., Xing, L., 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.
- Araujo, F.G., Slifer, T., 2003. Different strains of *Toxoplasma gondii* induce different cytokine responses in CBA/Ca mice. *Infect Immun* 71, 4171-4174.
- Asai, T., Miura, S., Sibley, L.D., Okabayashi, H., Takeuchi, T., 1995. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 270, 11391-11397.
- Asundi, V.K., Stahl, R.C., Showalter, L., Conner, K.J., Carey, D.J., 1994. Molecular cloning and characterization of an isoprenylated 67 kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 1217, 257-265.
- Athenstaedt, K., Daum, G., 1999. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur J Biochem* 266, 1-16.
- Barragan, A., Sibley, L.D., 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol* 11, 426-430.
- Bartlett, N.W., Buttigieg, K., Kotenko, S.V., Smith, G.L., 2005. Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *J Gen Virol* 86, 1589-1596.

- Beaman, M.H., Hunter, C.A., Remington, J.S., 1994. Enhancement of intracellular replication of *Toxoplasma gondii* by IL-6. Interactions with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 153, 4583-4587.
- Behnke, M.S., Khan, A., Wootton, J.C., Dubey, J.P., Tang, K., Sibley, L.D., 2011. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9631-9636.
- Bermudes, D., Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Joiner, K.A., 1994. Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 68, 247-257.
- Billiau, A., 1996. Interferon-gamma in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 25-34.
- Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 607-623.
- Bluestone, J.A., Mackay, C.R., O'Shea, J.J., Stockinger, B., 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9, 811-816.
- Boehm, T., 2011. Design principles of adaptive immune systems. *Nat Rev Immunol* 11, 307-317.
- Boehm, T., Swann, J.B., 2014. Origin and evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Anim Biosci* 2, 259-283.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Futterer, A., Pfeffer, K., 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., Howard, J.C., 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Bohne, W., Holpert, M., Gross, U., 1999. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* 201, 248-254.
- Boothroyd, J.C., Grigg, M.E., 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5, 438-442.
- Boyle, J.P., Radke, J.R., 2009. A history of studies that examine the interactions of *Toxoplasma* with its host cell: Emphasis on in vitro models. *Int J Parasitol* 39, 903-914.
- Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Collier, S., Coombs, G.H., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Sanderson, S.J., Wastling, J.M., Boothroyd, J.C., 2005. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 280, 34245-34258.
- Briken, V., Ahlbrand, S.E., Shah, S., 2013. Mycobacterium tuberculosis and the host cell inflammasome: a complex relationship. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 62.
- Briscoe, J., Guschin, D., Rogers, N.C., Watling, D., Muller, M., Horn, F., Heinrich, P., Stark, G.R., Kerr, I.M., 1996. JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351, 167-171.
- Brodin, P., Lakshmikanth, T., Mehr, R., Johansson, M.H., Duru, A.D., Achour, A., Salmon-Divon, M., Karre, K., Hoglund, P., Johansson, S., 2010. Natural killer cell tolerance persists despite significant reduction of self MHC class I on normal target cells in mice. *PLoS One* 5.
- Buckland, A.G., Wilton, D.C., 2000. Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochim Biophys Acta* 1483, 199-216.

- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L., Tschopp, J., 1998. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 273, 12203-12209.
- Bustillo-Zabalbeitia, I., Montessuit, S., Raemy, E., Basanez, G., Terrones, O., Martinou, J.C., 2014. Specific interaction with cardiolipin triggers functional activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS One* 9, e102738.
- Butcher, B.A., Kim, L., Johnson, P.F., Denkers, E.Y., 2001. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J Immunol* 167, 2193-2201.
- Butcher, B.A., Kim, L., Panopoulos, A.D., Watowich, S.S., Murray, P.J., Denkers, E.Y., 2005. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol* 174, 3148-3152.
- Cai, G., Radzanowski, T., Villegas, E.N., Kastelein, R., Hunter, C.A., 2000. Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 165, 2619-2627.
- Cambrea, L.R., Hovis, J.S., 2007. Formation of three-dimensional structures in supported lipid bilayers. *Biophys J* 92, 3587-3594.
- Carey, K.L., Jongco, A.M., Kim, K., Ward, G.E., 2004. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot Cell* 3, 1320-1330.
- Carman, G.M., Han, G.S., 2011. Regulation of Phospholipid Synthesis in Yeast *Saccharomyces cerevisia*. *Annu Rev Biochem* 80, 859-883.
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D., 1999. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 31, 421-428.
- Carter, C.C., Gorbacheva, V.Y., 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.
- Carter, J.R., Kennedy, E.P., 1966. Enzymatic synthesis of cytidine diphosphate diglyceride. *J Lipid Res* 7, 678-783.
- Casey, P.J., Seabra, M.C., 1996. Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 271, 5289-5292.
- Cesbron-Delauw, M.F., 1994. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 10, 293-296.
- Chang, H.R., Grau, G.E., Pechere, J.C., 1990. Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 69, 33-37.
- Charron, A.J., Sibley, L.D., 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 115, 3049-3059.
- Chelbi-Alix, M.K., Wietzerbin, J., 2007. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie* 89, 713-718.
- Cheng, J.B., Townley, R.G., 1983. GTP increases airway muscarinic antagonist binding sites: an effect regulated by Mg²⁺. *Eur J Pharmacol* 88, 269-272.

Cheng, Y.S., Becker-Manley, M.F., Chow, T.P., 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., Patterson, C.E., 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.

Cheshire, J.L., Baldwin, A.S., Jr., 1997. Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation. *Mol Cell Biol* 17, 6746-6754.

Chuang, T.H., Ulevitch, R.J., 2000. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 11, 372-378.

Collazo, C.M., Yap, G.S., Sempowski, G.D., Lusby, K.C., Tessarollo, L., Vande Woude, G.F., Sher, A., Taylor, G.A., 2001. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J Exp Med* 194, 181-188.

Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., Joiner, K.A., 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125, 261-274.

Crawford, M.J., Thomsen-Zieger, N., Ray, M., Schachtner, J., Roos, D.S., Seeber, F., 2006. *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *EMBO J* 25, 3214-3222.

Darde, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol* 78, 786-794.

Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.

David, V., Leca, G., Vilmer, E., Guglielmi, P., Chouaib, S., Kanellopoulos, J., Sigaux, F., Bensussan, A., 1988. Expression of the T cell gamma gene by a functionally defined human T cell clone. Characterization at DNA, RNA, and cell membrane level. *Scand J Immunol* 27, 473-483.

de Kroon, A.I., Dolis, D., Mayer, A., Lill, R., de Kruijff, B., 1997. Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta* 1325, 108-116.

Debierre-Grockiego, F., Campos, M.A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M.G., Mansur, D.S., Weingart, R., Schmidt, R.R., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T., Schwarz, R.T., 2007. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 179, 1129-1137.

Decker, T., Lew, D.J., Cheng, Y.S., Levy, D.E., Darnell, J.E., Jr., 1989. Interactions of alpha- and gamma-interferon in the transcriptional regulation of the gene encoding a guanylate-binding protein. *EMBO J* 8, 2009-2014.

Decker, T., Lew, D.J., Darnell, J.E., Jr., 1991. Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Mol Cell Biol* 11, 5147-5153.

Deckert-Schluter, M., Rang, A., Weiner, D., Huang, S., Wiestler, O.D., Hof, H., Schluter, D., 1996. Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Lab Invest* 75, 827-841.

- Degrandi, D., Konermann, C., Beuter-Gunia, C., Kresse, A., Wurthner, J., Kurig, S., Beer, S., 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., Pfeffer, K., 2013. Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 294-299.
- Delorme-Walker, V., Abrivard, M., Lagal, V., Anderson, K., Perazzi, A., Gonzalez, V., Page, C., Chauvet, J., Ochoa, W., Volkmann, N., Hanein, D., Tardieux, I., 2012. Toxofilin upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics, facilitating *Toxoplasma* invasion. *J Cell Sci* 125, 4333-4342.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H., 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15623-15628.
- DeVay, R.M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L.L., Hoppins, S., Stahlberg, H., Nunnari, J., 2009. Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol* 186, 793-803.
- Dias, P., Shea, A.L., Inglis, C., Giannoni, F., Lee, L.N., Sarawar, S.R., 2008. Primary clearance of murine gammaherpesvirus 68 by PKC θ -/- CD8 T cells is compromised in the absence of help from CD4 T cells. *J Virol* 82, 11970-11975.
- Dobrowolski, J.M., Sibley, L.D., 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84, 933-939.
- Doherty, T.M., Seder, R.A., Sher, A., 1996. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 156, 735-741.
- Du, X., Poltorak, A., Wei, Y., Beutler, B., 2000. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 11, 362-371.
- Dubey, J.P., 1992. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *J Parasitol* 78, 151-153.
- Dubey, J.P., 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 44, 592-602.
- Dubey, J.P., Thayer, D.W., Speer, C.A., Shen, S.K., 1998. Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int J Parasitol* 28, 369-375.
- Dubremetz, J.F., 1998. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol* 6, 27-30.
- Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D., Joiner, K.A., 1993. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol Res* 79, 402-408.
- Dubuy, H.G., Dubuy, H.G., Riley, F., Showacre, J.L., 1964. Tetracycline Fluorescence in Permeability Studies of Membranes around Intracellular Parasites. *Science* 145, 163-165.
- Dunn, P.L., North, R.J., 1991. Limitations of the adoptive immunity assay for analyzing anti-*Listeria* immunity. *J Infect Dis* 164, 878-882.
- Ealick, S.E., Cook, W.J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T.L., Trotta, P.P., Bugg, C.E., 1991. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science* 252, 698-702.

- Eilers, M., Verner, K., Hwang, S., Schatz, G., 1988. Import of proteins into mitochondria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 319, 121-126.
- El Bissati, K., Levigne, P., Lykins, J., Adlaoui, E.B., Barkat, A., Berraho, A., Laboudi, M., El Mansouri, B., Ibrahim, A., Rhajaoui, M., Quinn, F., Murugesan, M., Seghrouchni, F., Gomez-Marín, J.E., Peyron, F., McLeod, R., 2018. Global initiative for congenital toxoplasmosis: an observational and international comparative clinical analysis. *Emerg Microbes Infect* 7, 165.
- El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M.N., Mercereau-Puijalón, O., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J.F., 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6, 5773-5784.
- Feduchi, E., Carrasco, L., 1991. Mechanism of inhibition of HSV-1 replication by tumor necrosis factor and interferon gamma. *Virology* 180, 822-825.
- Feeley, E.M., Pilla-Moffett, D.M., Zwack, E.E., Piro, A.S., Finethy, R., Kolb, J.P., Martinez, J., Brodsky, I.E., Coers, J., 2017. Galectin-3 directs antimicrobial guanylate binding proteins to vacuoles furnished with bacterial secretion systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E1698-E1706.
- Fentress, S.J., Sibley, L.D., 2011. The secreted kinase ROP18 defends *Toxoplasma's* border. *Bioessays* 33, 693-700.
- Ferguson, D.J., Cesbron-Delauw, M.F., Dubremetz, J.F., Sibley, L.D., Joiner, K.A., Wright, S., 1999. The expression and distribution of dense granule proteins in the enteric (Coccidian) forms of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Exp Parasitol* 91, 203-211.
- Ferguson, D.J., Hutchison, W.M., 1987. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 411, 39-43.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E., Eisenlohr, L., Landel, C.P., Alnemri, E.S., 2010. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* 11, 385-393.
- Fichera, M.E., Roos, D.S., 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407-409.
- Fiedler, K., Hulsse, C., Straube, W., Briese, V., 1999. [Toxoplasmosis-antibody seroprevalence in Mecklenburg-Western Pomerania]. *Zentralbl Gynakol* 121, 239-243.
- Fischer, H.G., Bonifas, U., Reichmann, G., 2000. Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 164, 4826-4834.
- Fourmaux, M.N., Garcia-Reguet, N., Mercereau-Puijalón, O., Dubremetz, J.F., 1996. *Toxoplasma gondii* microneme proteins: gene cloning and possible function. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 55-58.
- Fraser, I.P., Koziel, H., Ezekowitz, R.A., 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10, 363-372.
- Frenkel, J.K., 1988. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today* 4, 273-278.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P., Miller, N.L., 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167, 893-896.

- Freyre, A., Dubey, J.P., Smith, D.D., Frenkel, J.K., 1989. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol* 75, 750-755.
- Fu, Y., Cui, X., Fan, S., Liu, J., Zhang, X., Wu, Y., Liu, Q., 2018. Comprehensive Characterization of *Toxoplasma* Acyl Coenzyme A-Binding Protein TgACBP2 and Its Critical Role in Parasite Cardiolipin Metabolism. *MBio* 9.
- Garcia-Sastre, A., Durbin, R.K., Zheng, H., Palese, P., Gertner, R., Levy, D.E., Durbin, J.E., 1998. The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J Virol* 72, 8550-8558.
- Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., Sher, A., 1993. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infect Agents Dis* 2, 139-149.
- Gazzinelli, R.T., Hakim, F.T., Hieny, S., Shearer, G.M., Sher, A., 1991. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146, 286-292.
- Gazzinelli, R.T., Hartley, J.W., Fredrickson, T.N., Chattopadhyay, S.K., Sher, A., Morse, H.C., 3rd, 1992. Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency: studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Infect Immun* 60, 4394-4401.
- Gebert, N., Joshi, A.S., Kutik, S., Becker, T., McKenzie, M., Guan, X.L., Mooga, V.P., Stroud, D.A., Kulkarni, G., Wenk, M.R., Rehling, P., Meisinger, C., Ryan, M.T., Wiedemann, N., Greenberg, M.L., Pfanner, N., 2009. Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: implications for Barth syndrome. *Curr Biol* 19, 2133-2139.
- Gewurz, H., Mold, C., Siegel, J., Fiedel, B., 1982. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* 27, 345-372.
- Gilly, M., Wall, R., 1992. The IRG-47 gene is IFN-gamma induced in B cells and encodes a protein with GTP-binding motifs. *J Immunol* 148, 3275-3281.
- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., Brink, R., 2010. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol* 11, 681-688.
- Greenlund, A.C., Farrar, M.A., Viviano, B.L., Schreiber, R.D., 1994. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J* 13, 1591-1600.
- Grimwood, J., Smith, J.E., 1995. *Toxoplasma gondii*: redistribution of tachyzoite surface protein during host cell invasion and intracellular development. *Parasitol Res* 81, 657-661.
- Gupta, S.L., Rubin, B.Y., 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.
- Gupta, V., Bhattacharya, S., Gupta, V., Natu, S.M., 2000. Increase in circulating products of lipid peroxidation (malonaldehyd) in streptozocin induced diabetic mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 44, 500-502.
- Gustafsson, M.G., 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* 198, 82-87.

- Gustafsson, M.G., Shao, L., Carlton, P.M., Wang, C.J., Golubovskaya, I.N., Cande, W.Z., Agard, D.A., Sedat, J.W., 2008. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J* 94, 4957-4970.
- Hager, K.M., Striepen, B., Tilney, L.G., Roos, D.S., 1999. The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 112 (Pt 16), 2631-2638.
- Hansen, S.B., 2015. Lipid agonism: The PIP2 paradigm of ligand-gated ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1851, 620-628.
- Havelaar, A.H., Brul, S., de Jong, A., de Jonge, R., Zwietering, M.H., Ter Kuile, B.H., 2010. Future challenges to microbial food safety. *Int J Food Microbiol* 139 Suppl 1, S79-94.
- Hayes, M.P., Freeman, S.L., Donnelly, R.P., 1995. IFN-gamma priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine* 7, 427-435.
- He, Q., Han, X., 2014. Cardiolipin remodeling in diabetic heart. *Chem Phys Lipids* 179, 75-81.
- Hell, S.W., 2009. Microscopy and its focal switch. *Nat Methods* 6, 24-32.
- Hell, S.W., Wichmann, J., 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19, 780-782.
- Hilton, D.J., Richardson, R.T., Alexander, W.S., Viney, E.M., Willson, T.A., Sprigg, N.S., Starr, R., Nicholson, S.E., Metcalf, D., Nicola, N.A., 1998. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 114-119.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., Reth, M., 1990. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343, 760-762.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172, 1561-1566.
- Hu, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, C.J., Roos, D.S., Murray, J.M., 2002. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell* 13, 593-606.
- Hu, S., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H., 2001. Apoptosis within mouse eye induced by *Toxoplasma gondii*. *Chin Med J (Engl)* 114, 640-644.
- Huang, C.L., 2007. Complex roles of PIP2 in the regulation of ion channels and transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1761-1765.
- Huang, K.C., Mukhopadhyay, R., Wingreen, N.S., 2006a. A curvature-mediated mechanism for localization of lipids to bacterial poles. *PLoS Comput Biol* 2, e151.
- Huang, Y., Liu, L., Shi, C., Huang, J., Li, G., 2006b. Electrochemical analysis of the effect of Ca²⁺ on cardiolipin-cytochrome c interaction. *Biochim Biophys Acta* 1760, 1827-1830.
- Huff, J., 2015. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution. *Nat. Methods* 12, i-ii.
- Hunter, C.A., Sibley, L.D., 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* 10, 766-778.

- Hunter, C.A., Subauste, C.S., Van Cleave, V.H., Remington, J.S., 1994. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 62, 2818-2824.
- Ihle, J.N., Kerr, I.M., 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11, 69-74.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.
- Jacobs, L., 1957. The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs, and man. *Public Health Rep* 72, 872-882.
- Janeway, C.A., Jr., 2001. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3, 1167-1171.
- Janeway, C.A., Jr. und, Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol*, pp. 197-216.
- Jang, J.H., Lee, C.S., Hwang, D., Ryu, S.H., 2012. Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res* 51, 71-81.
- Jian, X., Tang, W.K., Zhai, P., Roy, N.S., Luo, R., Gruschus, J.M., Yohe, M.E., Chen, P.W., Li, Y., Byrd, R.A., Xia, D., Randazzo, P.A., 2015. Molecular Basis for Cooperative Binding of Anionic Phospholipids to the PH Domain of the Arf GAP ASAP1. *Structure* 23, 1977-1988.
- Jiang, F., Ryan, M.T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N., Greenberg, M.L., 2000. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* 275, 22387-22394.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
- Johnson, L.L., 1992. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infect Immun* 60, 3719-3724.
- Joiner, K.A., Fuhrman, S.A., Miettinen, H.M., Kasper, L.H., Mellman, I., 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249, 641-646.
- Joiner, K.A., Roos, D.S., 2002. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol* 157, 557-563.
- Jones, J.L., Dubey, J.P., 2012. Foodborne toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 55, 845-851.
- Jones, T.C., Hirsch, J.G., 1972. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med* 136, 1173-1194.
- Kahne, T., Ansorge, S., 1994. Non-radioactive labelling and immunoprecipitation analysis of leukocyte surface proteins using different methods of protein biotinylation. *J Immunol Methods* 168, 209-218.
- Kalanxhi, E., Wallace, C.J., 2007. Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. *Biochem J* 407, 179-187.
- Kang, H., Suzuki, Y., 2001. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. *Infect Immun* 69, 2920-2927.

- Kasamatsu, J., Sutoh, Y., Fugo, K., Otsuka, N., Iwabuchi, K., Kasahara, M., 2010. Identification of a third variable lymphocyte receptor in the lamprey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14304-14308.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.
- Kim, B.H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Das, R., Tiwari, S., MacMicking, J.D., 2011. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science* 332, 717-721.
- Kim, K., Weiss, L.M., 2004. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 34, 423-432.
- Kim, K., Weiss, L.M., 2008. *Toxoplasma*: the next 100years. *Microbes Infect* 10, 978-984.
- Kim, S., Bauernfeind, F., Ablasser, A., Hartmann, G., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Hornung, V., 2010. *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 40, 1545-1551.
- Kissinger, J.C., Gajria, B., Li, L., Paulsen, I.T., Roos, D.S., 2003. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acids Res* 31, 234-236.
- Klamp, T., Boehm, U., Schenk, D., Pfeffer, K., Howard, J.C., 2003. A giant GTPase, very large inducible GTPase-1, is inducible by IFNs. *J Immunol* 171, 1255-1265.
- Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., Ghosh, S., 2013. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38, 119-130.
- Kochs, G., Bauer, S., Vogt, C., Frenz, T., Tschopp, J., Kalinke, U., Waibler, Z., 2010. Thogoto virus infection induces sustained type I interferon responses that depend on RIG-I-like helicase signaling of conventional dendritic cells. *J Virol* 84, 12344-12350.
- Kohler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D., Roos, D.S., 1997. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 275, 1485-1489.
- Konermann, C., Kresse, A., Beuter-Gunia, C., Wurthner, J., Degrandi, D., Pfeffer, K., Beer, S., 2007. In silico and in vitro characterization of mGBP4 splice variants. *DNA Cell Biol* 26, 847-851.
- Kooijman, E.E., Tieleman, D.P., Testerink, C., Munnik, T., Rijkers, D.T., Burger, K.N., de Kruijff, B., 2007. An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *J Biol Chem* 282, 11356-11364.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4, 69-77.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Muthukumar, G., Cook, J.R., Garotta, G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., et al., 1995. Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J Biol Chem* 270, 20915-20921.
- Krapp, C., Hotter, D., Gawanbacht, A., McLaren, P.J., Kluge, S.F., Sturzel, C.M., Mack, K., Reith, E., Engelhart, S., Ciuffi, A., Hornung, V., Sauter, D., Telenti, A., Kirchhoff, F., 2016. Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity. *Cell Host Microbe* 19, 504-514.

- Kravets, E., Degrandi, D., Ma, Q., Peulen, T.O., Klumpers, V., Felekyan, S., Kuhnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A., Pfeffer, K., 2016. Guanylate binding proteins directly attack *Toxoplasma gondii* via supramolecular complexes. *Elife* 5.
- Kravets, E., Degrandi, D., Weidtkamp-Peters, S., Ries, B., Konermann, C., Felekyan, S., Dargazanli, J.M., Praefcke, G.J., Seidel, C.A., Schmitt, L., Smits, S.H., Pfeffer, K., 2012. The GTPase activity of murine guanylate-binding protein 2 (mGBP2) controls the intracellular localization and recruitment to the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 287, 27452-27466.
- Krebs, D.L., Hilton, D.J., 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378-387.
- Kresse, A., Konermann, C., Degrandi, D., Beuter-Gunia, C., Wuerthner, J., Pfeffer, K., Beer, S., 2008. Analyses of murine GBP homology clusters based on in silico, in vitro and in vivo studies. *BMC Genomics* 9, 158.
- Kunzelmann, S., Praefcke, G.J., Herrmann, C., 2005. Nucleotide binding and self-stimulated GTPase activity of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1). *Methods Enzymol* 404, 512-527.
- Lacombe, M.L., Tokarska-Schlattner, M., Epand, R.F., Boissan, M., Epand, R.M., Schlattner, U., 2009. Interaction of NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology. *Biochimie* 91, 779-783.
- Lafuse, W.P., Brown, D., Castle, L., Zwilling, B.S., 1995. Cloning and characterization of a novel cDNA that is IFN-gamma-induced in mouse peritoneal macrophages and encodes a putative GTP-binding protein. *J Leukoc Biol* 57, 477-483.
- LaRosa, D.F., Stumhofer, J.S., Gelman, A.E., Rahman, A.H., Taylor, D.K., Hunter, C.A., Turka, L.A., 2008. T cell expression of MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3855-3860.
- Lee, J., Li, L., Gretz, N., Gebert, J., Dihlmann, S., 2012. Absent in Melanoma 2 (AIM2) is an important mediator of interferon-dependent and -independent HLA-DRA and HLA-DRB gene expression in colorectal cancers. *Oncogene* 31, 1242-1253.
- Legewie, L., Loschwitz, J., Steffens, N., Prescher, M., Wang, X., Smits, S.H.J., Schmitt, L., Strodel, B., Degrandi, D., Pfeffer, K., 2019. Biochemical and structural characterization of murine GBP7, a guanylate binding protein with an elongated C-terminal tail. *Biochem J* 476, 3161-3182.
- Leriche, M.A., Dubremetz, J.F., 1990. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol Res* 76, 559-562.
- Lew, D.J., Decker, T., Strehlow, I., Darnell, J.E., 1991. Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol Cell Biol* 11, 182-191.
- Li, G., Zhang, J., Sun, Y., Wang, H., Wang, Y., 2009. The evolutionarily dynamic IFN-inducible GTPase proteins play conserved immune functions in vertebrates and cephalochordates. *Mol Biol Evol* 26, 1619-1630.
- Lindenberg, V., Molleken, K., Kravets, E., Stallmann, S., Hegemann, J.H., Degrandi, D., Pfeffer, K., 2017. Broad recruitment of mGBP family members to *Chlamydia trachomatis* inclusions. *PLoS One* 12, e0185273.

- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., Toivio-Kinnucan, M., 1991. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol* 77, 126-132.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Ljunggren, H.G., Karre, K., 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244.
- Logothetis, D.E., Mahajan, R., Adney, S.K., Ha, J., Kawano, T., Meng, X.Y., Cui, M., 2015. Unifying Mechanism of Controlling Kir3 Channel Activity by G Proteins and Phosphoinositides. *Int Rev Neurobiol* 123, 1-26.
- Lourenco, E.V., Pereira, S.R., Faca, V.M., Coelho-Castelo, A.A., Mineo, J.R., Roque-Barreira, M.C., Greene, L.J., Panunto-Castelo, A., 2001. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology* 11, 541-547.
- Lovett, J.L., Marchesini, N., Moreno, S.N., Sibley, L.D., 2002. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J Biol Chem* 277, 25870-25876.
- Luevano-Martinez, L.A., Forni, M.F., dos Santos, V.T., Souza-Pinto, N.C., Kowaltowski, A.J., 2015. Cardiolipin is a key determinant for mtDNA stability and segregation during mitochondrial stress. *Biochim Biophys Acta* 1847, 587-598.
- Luft, B.J., Remington, J.S., 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15, 211-222.
- Ma, X., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., 1996. Regulation of interleukin-12 production. *Ann N Y Acad Sci* 795, 13-25.
- MacMicking, J.D., 2004. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol* 25, 601-609.
- MacMicking, J.D., 2012. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 367-382.
- Maenz, M., Schluter, D., Liesenfeld, O., Schares, G., Gross, U., Pleyer, U., 2014. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res* 39, 77-106.
- Madl, J., Villringer, S., Römer, W., 2017. Delving into Lipid-Driven Endocytic Mechanisms Using Biomimetic Membranes, Springer Protocols, Chemical and Synthetic Approaches in Membrane Biology, 17-36
- Man, S.M., Karki, R., Kanneganti, T.D., 2016. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol* 46, 269-280.
- Martens, S., Howard, J., 2006. The interferon-inducible GTPases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 559-589.
- Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M.L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A.B., Konrad, I., Kennerknecht, E., Reges, K., Holdenrieder, S., Braun, S., Reinhardt, C., Spannagl, M., Preissner, K.T., Engelmann, B., 2010. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 16, 887-896.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

- Meglei, G., McQuibban, G.A., 2009. The dynamin-related protein Mgm1p assembles into oligomers and hydrolyzes GTP to function in mitochondrial membrane fusion. *Biochemistry* 48, 1774-1784.
- Mercier, C., Dubremetz, J.F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L.D., Cesbron-Delauw, M.F., 2002. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell* 13, 2397-2409.
- Meunier, E., Broz, P., 2016. Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. *Cell Microbiol* 18, 168-180.
- Meunier, E., Dick, M.S., Dreier, R.F., Schurmann, N., Kenzelmann Broz, D., Warming, S., Roose-Girma, M., Bumann, D., Kayagaki, N., Takeda, K., Yamamoto, M., Broz, P., 2014. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* 509, 366-370.
- Meunier, E., Wallet, P., Dreier, R.F., Costanzo, S., Anton, L., Ruhl, S., Dussurgey, S., Dick, M.S., Kistner, A., Rigard, M., Degrandi, D., Pfeffer, K., Yamamoto, M., Henry, T., Broz, P., 2015. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nat Immunol* 16, 476-484.
- Michel, R., Schupp, K., Raether, W., Bierther, F.W., 1980. Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii* in vitro. *Int J Parasitol* 10, 309-313.
- Mineo, J.R., McLeod, R., Mack, D., Smith, J., Khan, I.A., Ely, K.H., Kasper, L.H., 1993. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol* 150, 3951-3964.
- Molestina, R.E., Payne, T.M., Coppens, I., Sinai, A.P., 2003. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Sci* 116, 4359-4371.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-1976.
- Mordstein, M., Kochs, G., Dumoutier, L., Renauld, J.C., Paludan, S.R., Klucher, K., Staeheli, P., 2008. Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog* 4, e1000151.
- Mordue, D.G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C.A., Sibley, L.D., 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* 167, 4574-4584.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46, 111-147.
- Muller, C.B., Enderlein, J., 2010. Image scanning microscopy. *Phys Rev Lett* 104, 198101.
- Mulligan, C.M., Le, C.H., deMooy, A.B., Nelson, C.B., Chicco, A.J., 2014. Inhibition of delta-6 desaturase reverses cardiolipin remodeling and prevents contractile dysfunction in the aged mouse heart without altering mitochondrial respiratory function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69, 799-809.
- Mun, H.S., Aosai, F., Norose, K., Piao, L.X., Fang, H., Akira, S., Yano, A., 2005. Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. *Infect Immun* 73, 4634-4642.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., Dixit, V.M., 1997. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278, 1612-1615.

- Nantais, D.E., Schwemmler, M., Stickney, J.T., Vestal, D.J., Buss, J.E., 1996. Prenylation of an interferon-gamma-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1. *J Leukoc Biol* 60, 423-431.
- Nguyen, T.T., Hu, Y., Widney, D.P., Mar, R.A., 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.
- Nicoletti, F., Zaccone, P., Di Marco, R., Di Mauro, M., Magro, G., Grasso, S., Mughini, L., Meroni, P., Garotta, G., 1996. The effects of a nonimmunogenic form of murine soluble interferon-gamma receptor on the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Endocrinology* 137, 5567-5575.
- Nordmann, A., Wixler, L., Boergeling, Y., Wixler, V., Ludwig, S., 2012. A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication. *FASEB J* 26, 1290-1300.
- Nussbaum, J.C., Van Dyken, S.J., von Moltke, J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Molofsky, A.B., Thornton, E.E., Krummel, M.F., Chawla, A., Liang, H.E., Locksley, R.M., 2013. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 502, 245-248.
- Ogawa, R., Nagao, K., Taniuchi, K., Tsuchiya, M., Kato, U., Hara, Y., Inaba, T., Kobayashi, T., Sasaki, Y., Akiyoshi, K., Watanabe-Takahashi, M., Nishikawa, K., Umeda, M., 2015. Development of a Novel Tetravalent Synthetic Peptide That Binds to Phosphatidic Acid. *PLoS One* 10, e0131668.
- Olszewski, M.A., Gray, J., Vestal, D.J., 2006. In silico genomic analysis of the human and murine guanylate-binding protein (GBP) gene clusters. *J Interferon Cytokine Res* 26, 328-352.
- Ortega-Barria, E., Boothroyd, J.C., 1999. A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem* 274, 1267-1276.
- Pancer, Z., Mayer, W.E., Klein, J., Cooper, M.D., 2004. Prototypic T cell receptor and CD4-like coreceptor are expressed by lymphocytes in the agnathan sea lamprey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13273-13278.
- Pangborn, M.C., 1945. A simplified preparation of cardiolipin, with note on purification of lecithin for serologic use. *J Biol Chem* 161, 71-82.
- Pangborn, M.C., 1946a. Cardiolipin and its application in a chemically purified antigen for the serodiagnosis of syphilis. *Proc N Y State Assoc Public Health Lab* 26, 26-29.
- Pangborn, M.C., 1946b. A study of the composition of cardiolipin. *Fed Proc* 5, 149.
- Pappas, G., Roussos, N., Falagas, M.E., 2009. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 39, 1385-1394.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., Ruggiero, F.M., 2004. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res* 94, 53-59.
- Parlog, A., Schluter, D., Dunay, I.R., 2015. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. *Parasite Immunol* 37, 159-170.
- Pearson, A.M., 1996. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8, 20-28.

- Pearson, K., 1909. Determination of the Coefficient of Correlation. *Science* 30, 23-25.
- Pestka, S., 2000. The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers* 55, 254-287.
- Pestka, S., 2007. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 282, 20047-20051.
- Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., Samuel, C.E., 1987. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56, 727-777.
- Petrosillo, G., Di Venosa, N., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., D'Agostino, D., Tiravanti, E., Fiore, T., Paradies, G., 2005. Mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia/reperfusion can be attenuated by oxygen tension control. Role of oxygen-free radicals and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 1710, 78-86.
- Pettersen, E.K., 1979. Destruction of *Toxoplasma gondii* by HC1 solution. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 87, 217-220.
- Pfefferkorn, E.R., 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 908-912.
- Pilla-Moffett, D., Barber, M.F., Taylor, G.A., Coers, J., 2016. Interferon-Inducible GTPases in Host Resistance, Inflammation and Disease. *J Mol Biol* 428, 3495-3513.
- Pilla, D.M., Hagar, J.A., Haldar, A.K., Mason, A.K., Degrandi, D., Pfeffer, K., Ernst, R.K., Yamamoto, M., Miao, E.A., Coers, J., 2014. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 6046-6051.
- Pleskot, R., Li, J., Zarsky, V., Potocky, M., Staiger, C.J., 2013. Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends Plant Sci* 18, 496-504.
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M.Y., Van Huffel, C., McNally, O., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., Chan, E.K., Ledesma, J., Roe, B., Clifton, S., Vogel, S.N., Beutler, B., 1998. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 24, 340-355.
- Praefcke, G.J., Geyer, M., Schwemmle, M., Robert Kalbitzer, H., Herrmann, C., 1999. Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J Mol Biol* 292, 321-332.
- Praefcke, G.J., McMahon, H.T., 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133-147.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A., Herrmann, C., 2000. Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* 403, 567-571.
- Radke, J.R., Striepen, B., Guerini, M.N., Jerome, M.E., Roos, D.S., White, M.W., 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 115, 165-175.
- Ramakrishnan, S., Serricchio, M., Striepen, B., Butikofer, P., 2013. Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Prog Lipid Res* 52, 488-512.
- Ramirez, K., Ditamo, Y., Galen, J.E., Baillie, L.W., Pasetti, M.F., 2010. Mucosal priming of newborn mice with *S. Typhi* Ty21a expressing anthrax protective antigen (PA) followed by parenteral PA-boost

- induces B and T cell-mediated immunity that protects against infection bypassing maternal antibodies. *Vaccine* 28, 6065-6075.
- Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., Hornung, V., Vogel, S.N., Szomolanyi-Tsuda, E., Fitzgerald, K.A., 2010. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11, 395-402.
- Razi, M., Tooze, S.A., 2009. Correlative light and electron microscopy. *Methods Enzymol* 452, 261-275.
- Reid, A.J., Vermont, S.J., Cotton, J.A., Harris, D., Hill-Cawthorne, G.A., Konen-Waisman, S., Latham, S.M., Mourier, T., Norton, R., Quail, M.A., Sanders, M., Shanmugam, D., Sohal, A., Wasmuth, J.D., Brunk, B., Grigg, M.E., Howard, J.C., Parkinson, J., Roos, D.S., Trees, A.J., Berriman, M., Pain, A., Wastling, J.M., 2012. Comparative genomics of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia differing in host range and transmission strategy. *PLoS Pathog* 8, e1002567.
- Reth, M., 1992. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10, 97-121.
- Robert-Gangneux, F., Darde, M.L., 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 25, 264-296.
- Roberts, F., Roberts, C.W., Johnson, J.J., Kyle, D.E., Krell, T., Coggins, J.R., Coombs, G.H., Milhous, W.K., Tzipori, S., Ferguson, D.J., Chakrabarti, D., McLeod, R., 1998. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* 393, 801-805.
- Rytomaa, M., Kinnunen, P.K., 1995. Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions. *J Biol Chem* 270, 3197-3202.
- Sad, S., Mosmann, T.R., 1995. Interleukin (IL) 4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8+ TC1 cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *J Exp Med* 182, 1505-1515.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Boothroyd, J.C., 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21, 476-481.
- Saffer, L.D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J.F., Schwartzman, J.D., 1992. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool* 39, 526-530.
- Saffer, L.D., Schwartzman, J.D., 1991. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J Protozool* 38, 454-460.
- Sakano, T., Hamamoto, K., Yahata, H., Yamashina, I., Usui, T., 1979. Increased number of T cells bearing IgG-Fc receptors in a case of Lowe's syndrome. *Hiroshima J Med Sci* 28, 39-41.
- Santos, J.C., Broz, P., 2018. Sensing of invading pathogens by GBPs: At the crossroads between cell-autonomous and innate immunity, *Journal of Leukocyte Biology* 104, 729-735
- Sasono, P.M., Smith, J.E., 1998. *Toxoplasma gondii*: an ultrastructural study of host-cell invasion by the bradyzoite stage. *Parasitol Res* 84, 640-645.

- Sauer, J.D., Witte, C.E., Zemansky, J., Hanson, B., Lauer, P., Portnoy, D.A., 2010. *Listeria monocytogenes* triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol. *Cell Host Microbe* 7, 412-419.
- Scanga, C.A., Aliberti, J., Jankovic, D., Tilloy, F., Bennouna, S., Denkers, E.Y., Medzhitov, R., Sher, A., 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* 168, 5997-6001.
- Scharton-Kersten, T., Caspar, P., Sher, A., Denkers, E.Y., 1996. *Toxoplasma gondii*: evidence for interleukin-12-dependent and-independent pathways of interferon-gamma production induced by an attenuated parasite strain. *Exp Parasitol* 84, 102-114.
- Scharton-Kersten, T.M., Yap, G., Magram, J., Sher, A., 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 185, 1261-1273.
- Schneider, L., Pellegatta, S., Favaro, R., Pisati, F., Roncaglia, P., Testa, G., Nicolis, S.K., Finocchiaro, G., d'Adda di Fagagna, F., 2013. DNA damage in mammalian neural stem cells leads to astrocytic differentiation mediated by BMP2 signaling through JAK-STAT. *Stem Cell Reports* 1, 123-138.
- Schrap, M., Hedman, A., Li, W., Tan, X., Anderson, R., 2012. PIP kinases from the cell membrane to the nucleus. *Subcell Biochem* 58, 25-59.
- Schreiber, R.D., Farrar, M.A., 1993. The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol Jpn* 28 Suppl 4, 88-94; discussion 95-86.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J., Joiner, K.A., 1994. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 509-513.
- Schwalbe, R.A., Dahlback, B., Coe, J.E., Nelsestuen, G.L., 1992. Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* 31, 4907-4915.
- Schwartzman, A., Moore, K., Wada, T., Tesch, G., Yoon, H.J., Kelley, V.R., 1998. IFN-gamma limits macrophage expansion in MRL-Fas(lpr) autoimmune interstitial nephritis: a negative regulatory pathway. *J Immunol* 160, 4074-4081.
- Schwartzman, J.D., Pfefferkorn, E.R., 1982. *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp Parasitol* 53, 77-86.
- Schwemmler, M., Staeheli, P., 1994. The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J Biol Chem* 269, 11299-11305.
- Scorrano, L., 2008. Caspase-8 goes cardiolipin: a new platform to provide mitochondria with microdomains of apoptotic signals? *J Cell Biol* 183, 579-581.
- Selleck, E.M., Fentress, S.J., Beatty, W.L., Degrandi, D., Pfeffer, K., Virgin, H.W.t., Macmicking, J.D., Sibley, L.D., 2013. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 9, e1003320.
- Shapira, S., Speirs, K., Gerstein, A., Caamano, J., Hunter, C.A., 2002. Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 185 Suppl 1, S66-72.

- Shapira, Y., Agmon-Levin, N., Selmi, C., Petrikova, J., Barzilai, O., Ram, M., Bizzaro, N., Valentini, G., Matucci-Cerinic, M., Anaya, J.M., Katz, B.S., Shoenfeld, Y., 2012. Prevalence of anti-Toxoplasma antibodies in patients with autoimmune diseases. *J Autoimmun* 39, 112-116.
- Shen, H., Heacock, P.N., Clancey, C.J., Dowhan, W., 1996. The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth. *J Biol Chem* 271, 789-795.
- Sheppard, C.J., Mehta, S.B., Heintzmann, R., 2013. Superresolution by image scanning microscopy using pixel reassignment. *Opt Lett* 38, 2889-2892.
- Shigeoka, A.A., Holscher, T.D., King, A.J., Hall, F.W., Kiosses, W.B., Tobias, P.S., Mackman, N., McKay, D.B., 2007. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 178, 6252-6258.
- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., Nathan, C., 1999. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10, 29-38.
- Shirey, C.M., Scott, J.L., Stahelin, R.V., 2016. Notes and Tips for Improving Quality of Lipid-Protein Overlay Assays. *Anal Biochem* 516, 9-12.
- Shirihai, O.S., Song, M., Dorn, G.W., 2nd, 2015. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circ Res* 116, 1835-1849.
- Shydlovskiy, S., Zienert, A.Y., Ince, S., Dovengerds, C., Hohendahl, A., Dargazanli, J.M., Blum, A., Gunther, S.D., Kladt, N., Sturzl, M., Schauss, A.C., Kutsch, M., Roux, A., Praefcke, G.J.K., Herrmann, C., 2017. Nucleotide-dependent farnesyl switch orchestrates polymerization and membrane binding of human guanylate-binding protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E5559-E5568.
- Sibley, L.D., 2009. Development of forward genetics in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39, 915-924.
- Sibley, L.D., Andrews, N.W., 2000. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic* 1, 100-106.
- Sibley, L.D., Hakansson, S., Carruthers, V.B., 1998. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr Biol* 8, R12-14.
- Sibley, L.D., Howe, D.K., 1996. Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 219, 3-15.
- Sibley, L.D., Niesman, I.R., Asai, T., Takeuchi, T., 1994. *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp Parasitol* 79, 301-311.
- Sibley, L.D., Pfefferkorn, E.R., Boothroyd, J.C., 1991. Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 7, 327-328.
- Sibley, L.D., Weidner, E., Krahenbuhl, J.L., 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315, 416-419.
- Sinai, A.P., Joiner, K.A., 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* 154, 95-108.
- Sinai, A.P., Webster, P., Joiner, K.A., 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* 110 (Pt 17), 2117-2128.
- Smith, J.E., 1995. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 25, 1301-1309.

- Sorace, J.M., Johnson, R.J., Howard, D.L., Drysdale, B.E., 1995. Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. *J Leukoc Biol* 58, 477-484.
- Sparagna, G.C., Chicco, A.J., Murphy, R.C., Bristow, M.R., Johnson, C.A., Rees, M.L., Maxey, M.L., McCune, S.A., Moore, R.L., 2007. Loss of cardiac tetralinoleoyl cardiolipin in human and experimental heart failure. *J Lipid Res* 48, 1559-1570.
- Speer, C.A., Tilley, M., Temple, M.E., Blixt, J.A., Dubey, J.P., White, M.W., 1995. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. *Mol Biochem Parasitol* 75, 75-86.
- Staeheli, P., Prochazka, M., Steigmeier, P.A., Haller, O., 1984. Genetic control of interferon action: mouse strain distribution and inheritance of an induced protein with guanylate-binding property. *Virology* 137, 135-142.
- Stark, J.J., Dillman, R.O., Schulof, R., Wiemann, M.C., Barth, N.M., Honeycutt, P.J., Soori, G., 1998. Interferon-alpha and chemohormonal therapy for patients with advanced melanoma: final results of a phase I-II study of the Cancer Biotherapy Research Group and the Mid-Atlantic Oncology Program. *Cancer* 82, 1677-1681.
- Steffens, N., Beuter-Gunia, C., Kravets, E., Reich, A., Legewie, L., Pfeffer, K., Degrandi, D., Essential role of mGBP7 for survival of *Toxoplasma gondii* infection. *mBio*, akzeptiert am 10.12.2019
- Steinfeldt, T., Konen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L.D., Hunn, J.P., Howard, J.C., 2015. Correction: Phosphorylation of Mouse Immunity-Related GTPase (IRG) Resistance Proteins Is an Evasion Strategy for Virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol* 13, e1002199.
- Stickney, J.T., Buss, J.E., 2000. Murine guanylate-binding protein: incomplete geranylgeranyl isoprenoid modification of an interferon-gamma-inducible guanosine triphosphate-binding protein. *Mol Biol Cell* 11, 2191-2200.
- Striepen, B., Crawford, M.J., Shaw, M.K., Tilney, L.G., Seeber, F., Roos, D.S., 2000. The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J Cell Biol* 151, 1423-1434.
- Striepen, B., He, C.Y., Matrajt, M., Soldati, D., Roos, D.S., 1998. Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 92, 325-338.
- Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J.F., Roos, D.S., 2001. Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 113, 45-53.
- Su, C., Evans, D., Cole, R.H., Kissinger, J.C., Ajioka, J.W., Sibley, L.D., 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 299, 414-416.
- Sugamura, K., Ishii, N., Weinberg, A.D., 2004. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol* 4, 420-431.
- Suh, B.C., Hille, B., 2008. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys* 37, 175-195.
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., Ward, G.E., 1996. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8413-8418.
- Svitkina, T.M., Borisy, G.G., 1998. Correlative light and electron microscopy of the cytoskeleton of cultured cells. *Methods Enzymol* 298, 570-592.

Swedlow, J.R., Hu, K., Andrews, P.D., Roos, D.S., Murray, J.M., 2002. Measuring tubulin content in *Toxoplasma gondii*: a comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2014-2019.

Tamura, T., Ueda, S., Yoshida, M., Matsuzaki, M., Mohri, H., Okubo, T., 1996. Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 229, 21-26.

Tatsuta, T., Langer, T., 2017. Intramitochondrial phospholipid trafficking. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862, 81-89.

Taylor, M.W., Feng, G.S., 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 5, 2516-2522.

Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., White, M., Wootton, J.C., Sibley, L.D., 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314, 1776-1780.

Thiebaut, A.C., Kipnis, V., Chang, S.C., Subar, A.F., Thompson, F.E., Rosenberg, P.S., Hollenbeck, A.R., Leitzmann, M., Schatzkin, A., 2007. Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. *J Natl Cancer Inst* 99, 451-462.

Tietzel, I., El-Haibi, C., Carabeo, R.A., 2009. Human guanylate binding proteins potentiate the anti-chlamydia effects of interferon-gamma. *PLoS One* 4, e6499.

Torgerson, P.R., Mastroiacovo, P., 2013. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ* 91, 501-508.

Torpiér, G., Charif, H., Darcy, F., Liu, J., Darde, M.L., Capron, A., 1993. *Toxoplasma gondii*: differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. *Exp Parasitol* 77, 13-22.

Trinchieri, G., 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 251-276.

Tripathi, R., Glaves, R., Marx, D., 2017. The GTPase hGBP1 converts GTP to GMP in two steps via proton shuttle mechanisms. *Chem Sci* 8, 371-380.

van der Laan, M., Meinecke, M., Dudek, J., Hutu, D.P., Lind, M., Perschil, I., Guiard, B., Wagner, R., Pfanner, N., Rehling, P., 2007. Motor-free mitochondrial presequence translocase drives membrane integration of preproteins. *Nat Cell Biol* 9, 1152-1159.

Van Hoeven, N., Belser, J.A., Szretter, K.J., Zeng, H., Staeheli, P., Swayne, D.E., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2009. Pathogenesis of 1918 pandemic and H5N1 influenza virus infections in a guinea pig model: antiviral potential of exogenous alpha interferon to reduce virus shedding. *J Virol* 83, 2851-2861.

Vestal, D.J., Gorbacheva, V.Y., Sen, G.C., 2000. Different subcellular localizations for the related interferon-induced GTPases, MuGBP-1 and MuGBP-2: implications for different functions? *J Interferon Cytokine Res* 20, 991-1000.

Vestal, D.J., Jeyaratnam, J.A., 2011. The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. *J Interferon Cytokine Res* 31, 89-97.

- Villena, I., Ancelle, T., Delmas, C., Garcia, P., Brezin, A.P., Thulliez, P., Wallon, M., King, L., Goulet, V., Toxosurv, n., National Reference Centre for, T., 2010. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Euro Surveill* 15.
- Vopel, T., Syguda, A., Britzen-Laurent, N., Kunzelmann, S., Ludemann, M.B., Dovengerds, C., Sturzl, M., Herrmann, C., 2010. Mechanism of GTPase-activity-induced self-assembly of human guanylate binding protein 1. *J Mol Biol* 400, 63-70.
- Wang, Y., Weiss, L.M., Orlofsky, A., 2009. Intracellular parasitism with *Toxoplasma gondii* stimulates mammalian-target-of-rapamycin-dependent host cell growth despite impaired signalling to S6K1 and 4E-BP1. *Cell Microbiol* 11, 983-1000.
- Wehner, M., Kunzelmann, S., Herrmann, C., 2012. The guanine cap of human guanylate-binding protein 1 is responsible for dimerization and self-activation of GTP hydrolysis. *FEBS J* 279, 203-210.
- Weiss, L.M., Kim, K., 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* 5, D391-405.
- Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S., Cao, Z., 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-847.
- Wilking, H., Thamm, M., Stark, K., Aebischer, T., Seeber, F., 2016. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep* 6, 22551.
- Williams, B.R., 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18, 6112-6120.
- Williams, M.E., Chang, T.L., Burke, S.K., Lichtman, A.H., Abbas, A.K., 1991. Activation of functionally distinct subsets of CD4+ T lymphocytes. *Res Immunol* 142, 23-28.
- Wolf, A., Cowen, D., Paige, B., 1939. Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. *Science* 89, 226-227.
- Wriessnegger, T., Leitner, E., Belegratis, M.R., Ingolic, E., Daum, G., 2009. Lipid analysis of mitochondrial membranes from the yeast *Pichia pastoris*. *Biochim Biophys Acta* 1791, 166-172.
- Xiao, J., Yolken, R.H., 2015. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf)* 213, 828-845.
- Xie, Q.W., Whisnant, R., Nathan, C., 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177, 1779-1784.
- Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J.S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., Ohshima, J., Sasai, M., Kayama, H., Okamoto, T., Huang, D.C., Soldati-Favre, D., Horie, K., Takeda, J., Takeda, K., 2012. A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 37, 302-313.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., Akira, S., 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-329.

- Yan, X.M., Guo, J., Pichurin, P., Tanaka, K., Jaume, J.C., Rapoport, B., McLachlan, S.M., 2000. Cytokines, IgG subclasses and costimulation in a mouse model of thyroid autoimmunity induced by injection of fibroblasts co-expressing MHC class II and thyroid autoantigens. *Clin Exp Immunol* 122, 170-179.
- Yang, C.Y., Frohman, M.A., 2012. Mitochondria: signaling with phosphatidic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1346-1350.
- Yang, J.S., Gad, H., Lee, S.Y., Mironov, A., Zhang, L., Beznoussenko, G.V., Valente, C., Turacchio, G., Bonsra, A.N., Du, G., Baldanzi, G., Graziani, A., Bourgoin, S., Frohman, M.A., Luini, A., Hsu, V.W., 2008. A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into Golgi maintenance. *Nat Cell Biol* 10, 1146-1153.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., Sher, A., 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.
- York, A.G., Parekh, S.H., Dalle Nogare, D., Fischer, R.S., Temprine, K., Mione, M., Chitnis, A.B., Combs, C.A., Shroff, H., 2012. Resolution doubling in live, multicellular organisms via multifocal structured illumination microscopy. *Nat Methods* 9, 749-754.
- Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M., Yoshida, T.O., 1995. Dissection of strain difference in acquired protective immunity against *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin bacillus (BCG). Macrophages regulate the susceptibility through cytokine network and the induction of nitric oxide synthase. *J Immunol* 155, 2057-2066.
- Young, B.P., Shin, J.J., Orij, R., Chao, J.T., Li, S.C., Guan, X.L., Khong, A., Jan, E., Wenk, M.R., Prinz, W.A., Smits, G.J., Loewen, C.J., 2010. Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. *Science* 329, 1085-1088.
- Zegarinska, J., Piascik, M., Sikorski, A.F., Czogalla, A., 2018. Phosphatidic acid - a simple phospholipid with multiple faces. *Acta Biochim Pol* 65, 163-171.
- Zhang, G.X., Xiao, B.G., Bai, X.F., van der Meide, P.H., Orn, A., Link, H., 1999. Mice with IFN-gamma receptor deficiency are less susceptible to experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 162, 3775-3781.

Internetquellen

- Biologics International Corp, Introduction of Type II Interferon:
<https://www.biologicscorp.com/blog/introduction-of-type-ii-interferon/>
- Robert Koch Institut, RKI-Ratgeber 2018, Toxoplasmose
rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Toxoplasmose.html
- Dr. Michael Blaber, Lecture 13, Lipids
mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture13/Lecture13.htm

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Arbeit wurde weder in der vorgelegten noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den

(Nora Steffens)

Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Bereitstellung dieses interessanten Forschungsthemas, für die exzellente Betreuung dieser Doktorarbeit in den letzten Jahren und insbesondere für die große Hilfe in den letzten Wochen.

Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt danke ich für die freundliche Betreuung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1208 und für die Übernahme des Gutachtens seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Daniel Degrandi für die konstante Unterstützung, für all die Antworten auf die vielen Fragen und für die netten Gespräche, manchmal fernab der Forschung. Ohne deine Hilfe wäre ich (zeitweise) verloren gewesen!

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Sonderforschungsbereiches 1208 bedanken für die vielen anregenden Gespräche, Seminare und Konferenzen. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Cordula Kruse und Katherina Lanzer für ihre Hilfe in sämtlichen „Doktoranden-belangen“. Außerdem möchte ich mich bei meinen daraus entstandenen Kooperationspartnern Philipp Hanisch, Dr. Sebastian Hänsch und Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters, Jennifer Loschwitz und Dr. Thorsten Eierhoff für die tolle, gemeinsame Entwicklung und Umsetzung von Ideen und Projekten bedanken.

Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Michael Hensel und Dr. Viktoria Liss (Universität Osnabrück) für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Miteinander.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene und der Virologie für die gute Atmosphäre im AG- und Lunch-Seminar, während der Sommerfeste und der Weihnachtsfeiern und besonders für die vielen Kooperationen, Hilfestellungen und netten Gespräche beim Mittagessen.

Ein besonderes Dankeschön geht an den besten Schreibraum: Sonja, Nicole, Julia, Larissa, Jenseblümchen, Marcel1 und Marcel2 – ihr habt stets dafür gesorgt, dass ich gerne zur Arbeit gefahren bin! Es gab immer etwas zu lachen oder zu diskutieren (besonders in Bezug auf diverse ProSieben-Shows). Getreu dem Motto „Urlaub fürs Gehirn“ sind besonders die Freitag-Nachmittage in Wahnsinn übergegangen... da macht man halt auch mal einen Kopfstand auf dem Stuhl! Und auch wenn Uschi, Anne und Lisa nicht offiziell im Schreibraum saßen, im Herzen waren sie immer ein Teil davon! Fühlt euch gedrückt (ja Julia – es wird wieder gedrückt 😊), ihr seid super und ich werde euch vermissen!

Ich bedanke mich bei meinen treuen Wegbegleitern, den Heimatmädeln, Jan, Rosa und Tobi. Außerdem bei all den lieben Leuten, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben und jetzt nie wieder Mett essen wollen. Vielen Dank für die notwendige Ablenkung!

Von ganzen Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und Alena, Opa Tons und Oma Margret bedanken. Ihr seid die allerbeste und liebevollste Familie. Vielen Dank für eure Unterstützung, Motivation und die immer offenen Ohren!

Ein besonders großes Dankeschön geht an Nico, der in den letzten Monaten Launen von mir ertragen musste, die ich so selbst nicht einmal kannte. Vielen Dank, dass du an meiner Seite bist und mich trotz allem immer zum Lachen bringen kannst.